

DISSERTAÇÃO – ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Mestrado Integrado em Medicina

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Universidade do Porto

# **Papel das biópsias líquidas no cancro esofágico, gástrico, pancreático e colo-retal**

Tiago Ribeiro da Costa

Orientador

Professor Doutor António Araújo

Professor Associado Convidado

Diretor de Serviço de Oncologia Médica do CHP

Junho de 2017



## Resumo

Apesar de não ser um conceito recente, a incessante investigação científico-tecnológica tem destacado o potencial da biópsia líquida na área da Oncologia. As suas inúmeras vantagens sobre a biópsia tecidual tornam-na a candidata ideal no rastreio, diagnóstico, estadiamento, monitorização terapêutica e definição de prognóstico nesta era de Medicina de precisão, na qual é indispensável ter em consideração toda a heterogeneidade inter-individual e intra-tumoral.

Pretende-se com esta revisão bibliográfica proceder à descrição do conceito de biópsias líquidas, bem como a discussão das suas potencialidades na prática da oncologia, sobretudo das células tumorais circulantes (CTCs) e dos ácidos nucleicos tumorais circulantes (ctNAs) no contexto de algumas das neoplasias mais frequentes do trato gastrointestinal, nomeadamente o cancro esofágico, gástrico, pancreático e colo-retal.

Procedeu-se a uma pesquisa bibliográfica através do motor de busca *PubMed/MEDLINE*, na qual se atribuiu prioridade a trabalhos de revisão que explorassem cada um dos tópicos aqui apresentados. Em alguns casos optou-se por apresentar informação relativa a artigos de investigação original, por falta de trabalhos de revisão sobre o assunto. Foi ainda coligida informação acerca dos ensaios registados nas bases de dados *ClinicalTrials.gov* e *EU Clinical Trials Register*, que visem a aplicação das biópsias líquidas nas patologias referidas. Foram apenas incluídos projetos de investigação ainda em curso ou a recrutar participantes, excluindo-se assim todos os outros.

Atualmente alguns reguladores aprovaram já a aplicação de componentes das biópsias líquidas, em contextos clínicos muito particulares, sendo o cancro colo-retal metastizado uma delas. Os resultados obtidos com CTCs e ctNAs até à data apresentam-se como sendo bastante promissores, sobretudo no que diz respeito à monitorização da resposta à terapêutica, tal como é ilustrado pelo volume de ensaios clínicos dirigidos a esta aplicação, registados em ambas as bases de dados consultadas.

## Palavras-chave

Biópsias líquidas, cancro esofágico, cancro gástrico, cancro pancreático, cancro colo-retal, células tumorais circulantes, DNA tumoral circulante, micro-RNA.

## **Abstract**

Although not a recent concept, the unceasing scientific-technological investigation has revealed the potential for liquid biopsies in Oncology. Its innumerable advantages over tissue biopsies make it the ideal choice in screening, diagnostic, staging, therapeutic assessment and prognosis definition in this era of precision medicine, in which inter-individual and intra-tumoral heterogeneity needs to be considered.

This bibliographic revision aims to describe the concept of liquid biopsies, as well as discuss its potential in Oncology, more specifically the role of circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumoral nucleic acids, in some of the most frequent gastrointestinal cancers, like esophageal, gastric, pancreatic and colo-rectal cancer.

A bibliographic search was made on *Pubmed/MEDLINE* search engines, in which bibliographic revisions were prioritized as long they explored the topics here presented. In some instances original investigation articles were included, since there was no summary works on the subject. It was also made a list of registred clinical trials in *ClinicalTrials.gov* and *EU Clinical Trials Register*, in which liquid biopsies were being studied in the cancers previously described. Only in the phase of accepting participants or ongoing trials were listed, excluding all the others.

Some regulators have already approved applications concerning liquid biopsies, in very particular clinical contexts, including metastatic colo-rectal cancer. Untill now results obtained with CTCs and ctNAs seem to be fairly promising, specially in what concerns therapeutic assessment, reflecting the volume of clinical trial listed in this paper with that objective.

## **Key-words**

Liquid biopsy, esophageal cancer, gastric cancer, pancreatic cancer, colo-rectal cancer, circulating tumor cells, circulating tumor DNe, micro-RNA.

## **Dedicatória**

Ao meu irmão André, que apesar de todas as diferenças, sempre vibrou genuinamente com todas as minhas vitórias.

Aos meus pais e à Marta, que sempre foram o porto-seguro na, nem sempre tranquila, conquista dessas vitórias.

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor António Araújo, pela prontidão em aceder ao meu pedido de orientação deste trabalho e pela disponibilidade em apoiar toda a sua conceção, durante todo o seu longo processo.

Aos meus colegas que contribuíram com a sua arte e olhar crítico na realização deste trabalho.

À Adriana Lages pela prontidão em colaborar e pelo enriquecimento deste trabalho através das suas ilustrações.

## Índice

Introdução .....	1
Biópsias líquidas .....	3
Células tumorais circulantes .....	5
Ácidos nucleicos tumorais circulantes .....	8
Fontes de biópsias líquidas .....	11
Cancro esofágico .....	12
Células tumorais circulantes .....	12
Ácidos nucleicos tumorais circulantes .....	13
Cancro gástrico.....	15
Células tumorais circulantes .....	15
Ácidos nucleicos tumorais circulantes .....	15
Cancro pancreático .....	17
Células tumorais circulantes .....	17
Ácidos nucleicos tumorais circulantes .....	18
Cancro colo-retal .....	20
Células tumorais circulantes .....	20
Ácidos nucleicos tumorais circulantes .....	21
Ensaio clínico.....	24
<i>ClinicalTrials.gov</i> .....	24
<i>EU Clinical Trials Register</i> .....	27
Conclusões .....	28
Bibliografia .....	31

## **Abreviaturas**

CTCs	Circulating Tumor Cells
ctNAs	Circulating Tumor Nucleic Acids
ctDNA	Circulating Tumor DNA
miRNA	microRNA
CEA	Carcinoembryonic antigen
FDA	Food and Drug Administration
snoRNA	Small nucleolar RNA
snRNA	Small nuclear RNA
piRNA	piwi-interacting RNA
lncRNA	long noncoding RNA
NGS	Next-generation sequencing

## Introdução

### ***Biópsias líquidas – Medicina de precisão em evolução***

A prática da medicina de precisão constitui um avanço significativo na abordagem à patologia oncológica, comparativamente com o paradigma precedente, iniciado pelos trabalhos de Sidney Farber<sup>1</sup>, no qual se instituíam terapêuticas citotóxicas, dirigidas apenas à destruição indiscriminada de células com elevada taxa de divisão. Atualmente focamos a atenção em tratamentos dirigidos mais especificamente à biologia aberrante da célula neoplásica, que poderá encontrar-se adulterada numa miríade de formas, ilustrando assim a importância do conceito de heterogeneidade tumoral inter-individual. Siddhartha Mukherjee descreve de uma forma brilhante esta heterogeneidade tumoral, afirmando que “as células normais são idênticas na sua normalidade, mas as células malignas tornam-se infelizmente malignas de formas únicas”<sup>2</sup>.

Precisamente por este motivo as biópsias e aspirados de tecido tumoral constituem uma peça basilar na prática da oncologia<sup>3,4</sup>, desde o diagnóstico até ao planeamento terapêutico, por permitirem conhecer exatamente as alterações genéticas subjacentes a cada tumor. Contudo, Longo et al advertem para o facto de, para além da heterogeneidade tumoral inter-individual, ser também necessário que a medicina de precisão tenha em consideração a heterogeneidade genómica intra-tumoral<sup>5</sup>, isto é, entre as diferentes células do próprio tumor primário, bem como a sua evolução mutacional divergente<sup>6</sup>. Para que haja um seguimento verdadeiramente individualizado de cada doente, torna-se imperioso conhecer a heterogeneidade intra-tumoral, bem como a sua evolução: desde as suscetibilidades iniciais à terapêutica, até à aquisição de resistências, remissões e eventuais recidivas. De facto sabemos que as terapêuticas dirigidas da medicina de precisão podem tornar-se ineficazes, precisamente devido a esta heterogeneidade intra-tumoral, como é ilustrado pelo exemplo clássico do imatinib<sup>7</sup>. Torna-se por isso evidente a necessidade de investir em novos métodos de diagnóstico e *follow-up*, capazes de lidar com esta heterogeneidade espacial<sup>8,9</sup>. É também necessário implementar terapêuticas que, para além de apresentarem atividade sobre a massa tumoral primária, possam também ser eficazes na destruição de células metastáticas em circulação ou já mesmo em formação de metástases, uma vez que as terapêuticas dirigidas são principalmente implementadas em situações em que já há doença disseminada<sup>10</sup>. A presença de diferentes mutações entre tumores primários e as suas metástases foi já documentada em vários trabalhos<sup>6,11,12</sup>, ilustrando assim aquilo que conhecemos como heterogeneidade tumoral temporal<sup>8</sup>. Acredita-se mesmo que a evolução celular divergente, entre as células do tumor primário e das suas metástases, constitua a principal explicação para o insucesso terapêutica na patologia mais avançada<sup>9</sup>.

A obtenção de biópsias de tecido tumoral é um procedimento invasivo, sujeito a erros de amostragem, por vezes doloroso e até tecnicamente impossível ou apenas capaz de recolher amostras diminutas (dada a localização ou tamanho da lesão em estudo)<sup>4</sup>, tornando impraticável a obtenção seriada de tecido tumoral, que permita acompanhar toda esta heterogeneidade tumoral<sup>13</sup>. Na tentativa de colmatar algumas destas dificuldades, o seguimento da evolução tumoral passa a depender da realização de exames imagiológicos, acarretando riscos adicionais decorrentes da exposição a radiação ionizante<sup>14</sup>. No caso específico dos tumores gastrointestinais, a biópsia tecidular está associada à realização de procedimentos invasivos, como a endoscopia digestiva alta no cancro do esófago<sup>15</sup> ou a colonoscopia no cancro colo-retal<sup>16</sup>.



Dadas estas dificuldades associadas às biópsias tecidulares e à radiação ionizante, nos últimos anos tem-se registado um interesse crescente num conceito antigo, que agora ressurgiu como uma possível solução: a biópsia líquida. Trata-se de uma amostra de plasma ou soro, ou até mesmo de outros fluídos corporais como a saliva, que visa a deteção e análise de células tumorais circulantes (*circulating tumor cells – CTCs*), ou outros constituintes celulares provenientes de um neoplasma, obviando assim procedimentos diagnósticos mais caros e invasivos<sup>3,14,17</sup>, bem como a exposição a radiação ionizante<sup>18</sup>. Para além das CTCs, podem ainda ser detetados, por exemplo, ácidos nucleicos tumorais em circulação (*circulating tumor nucleic acids – ctNAs*) e as vesículas extracelulares (exossomas, microvesículas, entre outros)<sup>3,13</sup>. Os ctNAs incluem vários grupos de marcadores, como o ADN tumoral circulante (*circulating tumoral DNA – ctDNA*) e os micro-ARN (*micro-RNAs – miRNAs*). Em amostras de outros fluídos corporais é ainda possível detetar marcadores adicionais, como é o caso de metabolitos ou até microbiota comensal<sup>19</sup>.

Na prática clínica atual já dispomos de alguns biomarcadores tumorais detetáveis em amostras sanguíneas, como é o caso do antígeno carcino-embrionário (*carcinoembryonic antigen – CEA*), do CA 125 e do CA 19.9. Não obstante a aplicação destes no *follow-up* de doentes, a sua baixa sensibilidade e especificidade tornam pertinente a procura de alternativas<sup>14</sup>. Inclusivamente a pesquisa de CTCs demonstrou já um valor prognóstico superior, comparativamente com o CEA e o CA15-3<sup>20</sup>.

Posto tudo isto, a realização de rastreio, diagnóstico e monitorização com recurso a biópsias líquidas revela-se indubitavelmente vantajosa na prática futura da oncologia. No contexto da patologia tumoral gastrointestinal é até possível recorrer à deteção de ctNAs a partir de uma amostra de saliva, evitando qualquer tipo de procedimento invasivo<sup>19</sup>, o que por si só ilustra o enorme potencial da introdução das biópsias líquidas na prática clínica.

### ***As biópsias líquidas na patologia neoplásica do trato gastrointestinal***

Pretende-se com esta revisão bibliográfica proceder a descrição do conceito de biópsias líquidas, bem como a discussão das suas potencialidades no rastreio, diagnóstico, planeamento terapêutico, monitorização da resposta à terapêutica e determinação prognóstica em doentes com algumas das neoplasias mais frequentes do trato gastrointestinal: cancro esofágico, gástrico, pancreático e colo-retal. No que concerne às biópsias líquidas, procurei nesta revisão centrar-me no papel das CTCs e dos ctNA (incluindo o ctDNA e miRNAs), por serem os mais amplamente discutidos na literatura científica e porque uma revisão exaustiva de todos os potenciais biomarcadores seria impraticável, dentro dos moldes previstos para esta dissertação.

A bibliografia que serviu de base a este trabalho foi obtida através do motor de busca PubMed/MEDLINE, tendo este sido consultado pela última vez no mês de janeiro de 2017. As palavras-chave utilizadas compreenderam os termos “*liquid biopsy*”, “*circulating tumor cells*”, “*circulating free nucleic acids*”, “*miRNAs*”, “*exossomes*”, “*esophageal cancer*”, “*gastric cancer*”, “*pancreatic cancer*” e “*colo-rectal cancer*”. Procurei dar prioridade a trabalhos de revisão que explorassem cada um dos tópicos aqui apresentados. Em alguns casos não foi possível encontrar tais trabalhos, pelo que a informação apresentada é referente a artigos de investigação original. Foi ainda coligida informação acerca dos ensaios registados nas bases de dados *ClinicalTrials.gov* e *EU Clinical Trials Register*, consultadas pela última vez no mês de abril de 2017, que visem a aplicação das biópsias líquidas nas patologias referidas. Foram apenas incluídos projetos de investigação ainda em curso ou a recrutar participantes, excluindo-se assim todos os outros.

## Biópsias líquidas

Inicialmente as biópsias líquidas cingiam-se apenas à deteção de CTCs, descritas em 1869 por Ashworth<sup>21</sup>. Mais tarde passaram a incluir ctDNAs, descritos inicialmente em 1948<sup>22</sup>, miRNAs e vesículas extracelulares<sup>14</sup>. Atualmente abrangem toda uma panóplia de potenciais biomarcadores, desde simples metabolitos, até anticorpos e microbiota comensal<sup>19</sup>, que mais do que simples alternativas, revelam complementaridade no diagnóstico e tratamento da patologia neoplásica<sup>23</sup>.

Esta constante evolução torna desafiante a própria definição de “biópsia líquida”. No entanto é possível delinear os requisitos que os seus biomarcadores deverão cumprir: obtenção através de intervenções não-invasivas; quantificação laboratorial pouco dispendiosa; especificidade elevada; fácil transferência dos seus resultados de modelos animais experimentais para humanos; identificação precoce de patologia (numa fase pré-sintomática) e monitorização da sua resposta à terapêutica<sup>24</sup>. De ano para ano tem-se registado um número crescente de publicações acerca do tema<sup>8</sup>. Até ao final de dezembro de 2015 registavam-se mais de 17.000 artigos na base de dados da *Pubmed*, referentes a investigação em CTCs<sup>23</sup>. Os miRNAs representam um conceito mais recente enquanto biomarcador, mas também estes registam um número significativo de publicações na *Pubmed*: mais de 2.000 publicações até ao final de 2014<sup>3</sup>. Este interesse crescente deve-se precisamente à incessante evolução e cumprimento da maior parte dos requisitos anteriormente apresentados.

A implementação das biópsias líquidas na prática clínica tem a potencialidade de permitir<sup>17,23</sup>:

- O rastreio e diagnóstico precoce de vários cancros;
- A definição de grupos de suscetibilidade a determinadas terapêuticas;
- A monitorização da resposta do doente à terapêutica médica e/ou cirúrgica;
- A definição do prognóstico associado a cada caso;

Alguns dos biomarcadores analisados em biópsias líquidas têm a capacidade de detetar doença precocemente, por vezes com vários meses de antecedência quando comparados com exames imagiológicos. Através das biópsias líquidas poderá também ser possível definir grupos de suscetibilidade terapêutica, pois alguns desses biomarcadores demonstram valor preditivo de resposta terapêutica a determinados fármacos. Para além da possibilidade de dirigir a terapêutica mais adequada a cada doente – um dos baluartes da medicina de precisão -, permite também poupar alguns doentes a terapêuticas fúteis, evitando-se efeitos laterais indesejados<sup>9</sup>. Independentemente da terapêutica implementada – cirurgia, radioterapia ou quimioterapia -, as biópsias líquidas poderão também ter um papel importante na monitorização da resposta, isto é, a resposta efetiva ao tratamento (redução de carga tumoral), bem como na deteção de resistências e recidivas tumorais. Por fim, mas não menos importante, poderá ainda estabelecer-se um perfil prognóstico mais adequado a cada caso, de acordo com o risco de recidiva e de metastização. A todas estas vantagens acresce a conveniência da realização de procedimentos minimamente invasivos, passíveis de serem repetidos várias vezes<sup>6</sup>, ao contrário das biópsias tecidulares convencionais. Contudo, tal como acontece com as biópsias tecidulares, o sucesso das biópsias líquidas depende de uma adequada articulação entre as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica do seu processamento, permitindo assim uma *standardização* do processo de colheita e análise<sup>17</sup>.

Alguns autores são um pouco cautelosos em relação ao entusiasmo com as biópsias líquidas, assegurando que as biópsias tecidulares continuarão a desempenhar um papel central<sup>17</sup>. Não obstante, afirmam também que no futuro a maior parte do processo de seguimento de doentes oncológicos ocorrerá com recurso às biópsias líquidas, sendo altamente provável que estas sejam cada vez mais utilizadas nos próximos tempos<sup>17,23</sup>. Em alguns casos poderão mesmo até constituir uma alternativa mais vantajosa, sobretudo em doentes mais debilitados, dada a sua menor invasividade<sup>23</sup>.

Até à data o único teste genético, com base numa biópsia líquida, que recebeu uma aprovação formal pela *Food and Drug Administration* (FDA) foi o *cobas EGFR Mutation Test v2*<sup>25</sup>, utilizado em casos de cancros pulmonares de células não-pequenas. Trata-se de um teste capaz de detetar a presença de ctDNA, que contenha deleções do exão 19 ou mutações de substituição do exão 21 (L858R), preditivas de resposta terapêutica ao erlotinib. Existe ainda outra aprovação pela FDA, referente a um método de isolamento de CTCs, que será discutido em seguida.

### Células tumorais circulantes

O papel central das CTCs no processo de metastização remonta à hipótese de “sementes e solo”, inicialmente proposta por Stephen Paget<sup>26</sup> e corroborada por inúmeros trabalhos posteriores<sup>27</sup>. Atualmente detetam-se CTCs isoladas ou em aglomerados com mais de 50 células (micro-êmbolos tumorais circulantes), em doentes com cancros de estádios precoces e metastáticos<sup>13,28</sup>, como que numa “fase leucémica” dos tumores sólidos<sup>29</sup>.

Apesar do seu curto tempo de circulação (semi-vida aproximada de 1-2,4 horas) conferir uma elevada precisão e sensibilidade na representação do repertório celular de tumores primários e secundários<sup>30</sup>, estima-se que apenas 2,5% e 0,01% de todas as CTCs sejam capazes de desenvolver, respetivamente, micrometástases e macrometástases<sup>31-33</sup>, levantando assim questões em relação à sua capacidade diagnóstica de doença metastática. De facto apesar de existirem várias evidências a favor da hipótese de estas CTCs corresponderem a agentes iniciadores de metastização<sup>23</sup>, esta não é ainda uma hipótese absolutamente consensual<sup>28</sup>. Porém, alguns trabalhos experimentais demonstraram já o seu potencial de iniciação metastática, enquanto CTCs isoladas e micro-êmbolos, verificando-se mesmo que estes últimos têm um potencial metastático 23 a 50 vezes superior<sup>28</sup>, apesar de serem muito menos frequentes<sup>34</sup>.

Até à data a FDA aprovou apenas um método de deteção e isolamento de CTCs - *CellSearch*<sup>®13</sup> - que já demonstrou utilidade clínica no seguimento de doentes com cancro do cólon metastático, mama, próstata e cancros da cabeça e do pescoço<sup>17</sup>. Baseia-se no isolamento das CTCs através da expressão de moléculas de adesão celular epitelial (EpCAM), assim como pela imuno-marcação com anticorpos dirigidos a citoqueratinas (CK 8, 18, 19)<sup>9,35</sup>. Outros testes de deteção e isolamento de CTCs recorrem a outros marcadores, como é o caso do CA 15-3, CD44, recetores (HER)-2, bem como algumas propriedades celulares físicas, como o tamanho, densidade, deformabilidade e propriedades elétricas e magnéticas, entre outras<sup>8,10,13,18,35</sup>. Através da deteção pelo *CellSearch*<sup>®</sup>, as CTCs são então definidas como EpCAM-positivas, com um diâmetro igual ou superior a 4 µm, CK8/18/19-positiva e CD45-negativas<sup>9</sup>. A marcação negativa para o CD45 permite excluir o isolamento de leucócitos circulantes.

A deteção de CTCs com base no EpCAM é apenas capaz de detetar 75% dos cancros analisados<sup>18</sup>, uma vez que este é um marcador presente em apenas uma porção das células com potencial metastático<sup>17,35</sup>, mais concretamente aquelas que ainda não sofreram a transição epitélio-mesenquimatosa necessária ao pleno desenvolvimento de metástases<sup>9,10</sup>. De facto as CTCs EpCAM-negativas que iniciaram essa transição podem mesmo constituir uma subpopulação celular de maior quimiorresistência<sup>9,36</sup>, e por isso de maior interesse na sua deteção, com vista a instituir tratamentos potencialmente curativos. A própria associação de CTCs com outras células (macrófagos, p. ex.), poderá dificultar a deteção destes biomarcadores na maior parte dos sistemas de isolamento de CTCs<sup>37</sup>. Para além desta origem de falsos-negativos com o *CellSearch*<sup>®</sup>, podem também surgir falsos-positivos resultantes da identificação de células circulantes de origem benigna, como acontece em patologias benignas do cólon, nomeadamente a doença inflamatória intestinal e a diverticulose<sup>38</sup>. Existem já vários grupos a otimizar dispositivos que permitam detetar CTCs EpCAM negativas<sup>18,23</sup>.

Existem também algumas questões relacionadas com a interpretação do número de CTCs e o seu verdadeiro significado em cada entidade nosológica, pois em alguns tipos de cancros esofágicos<sup>39</sup> e do cólon moderadamente diferenciados<sup>40</sup> a expressão de EpCAM foi associada a uma maior sobrevivência, enquanto em doentes com cancro pancreático associou-se a um pior prognóstico<sup>41</sup>.

Além do seu isolamento, as CTCs poderão ainda informar acerca das alterações genéticas tumorais, através da sua caracterização molecular e genómica (presença de mutações ou alterações cromossómicas estruturais), análises de expressão (quantificação da expressão de mRNA, por exemplo), análises proteómicas (detecção de proteínas produzidas pelas CTCs) ou ainda análises funcionais (cultura de CTCs, com documentação de capacidade metastática ou suscetibilidade terapêutica)<sup>18,28</sup>. Estas técnicas visam o estudo das CTCs ao nível do DNA, RNA e das suas proteínas, permitindo assim uma melhor compreensão da heterogeneidade tumoral espacial e temporal<sup>9</sup>. A caracterização genómica e molecular poderá ajudar a colmatar falhas de especificidade inerentes ao *CellSearch*<sup>®</sup>, uma vez que permite destrinçar diferentes perfis genómicos e proteómicos entre células de origem benigna e tumoral<sup>28</sup>. A caracterização molecular permite também identificar alvos terapêuticos, contribuindo assim para uma oncologia de precisão. Porém, existem ainda algumas dúvidas em relação a este tipo de utilização das CTCs<sup>18,42</sup>, nomeadamente em relação ao número necessário de células a analisar e à sua representatividade, tendo em conta a heterogeneidade tumoral. Apesar de estes métodos de análise serem laboratorialmente exequíveis, é também necessário agora demonstrar que são procedimentos com utilidade clínica, isentos de uma exigência proibitiva de tempo e recursos na sua execução.

#### ***Rastreio e diagnóstico precoce***

Em estadios precoces da doença é possível identificar CTCs em amostras de sangue periférico, independentemente do seu potencial metastático<sup>28</sup>, Ilustrando assim o seu potencial enquanto biomarcador de rastreio e diagnóstico precoce. Resultados preliminares da deteção de CTCs em doentes com DPOC, com risco aumentado de neoplasia pulmonar, demonstraram que os resultados positivos precediam em 1 a 4 anos o diagnóstico imagiológico, permitindo assim uma resseção tumoral completa<sup>23</sup>. Recorde-se, no entanto, que alguns autores advertem para o facto de, em algumas patologias benignas do cólon, poderem surgir falsos-positivos com os atuais métodos de deteção de CTCs<sup>38</sup>. Aguarda-se então por mais trabalhos de validação destes biomarcadores como forma de rastreio, bem como um maior investimento nas técnicas de deteção de CTCs

Apesar das CTCs já terem sido incorporadas no sistema de estadiamento TNM, nomeadamente no cancro de mama, são ainda detetadas em níveis muito baixos e a sua utilidade clínica atual é questionável em doença detetada precocemente<sup>23</sup>.

#### ***Monitorização da resposta à terapêutica***

Desde o cancro da mama até ao cancro da próstata, vários trabalhos demonstraram já um papel superior das CTCs, comparativamente com outros marcadores séricos atualmente empregues, enquanto marcadores de resposta à terapêutica<sup>23</sup>.

A incapacidade na redução dos níveis de CTCs, bem como a sua recuperação após instituição terapêutica, poderão representar, respetivamente, resistência ao tratamento e recidiva tumoral. No entanto, poderá ser difícil determinar o impacto na sobrevivência da deteção de CTCs, precisamente devido à sua elevada sensibilidade enquanto biomarcador de resposta à terapêutica. Isto porque permitem identificar mais facilmente doentes resistentes à primeira linha de tratamento (isto é, com uma doença de base mais agressiva), para os quais ainda não dispomos de alternativas terapêuticas verdadeiramente eficazes<sup>9</sup>, tal como foi demonstrado num ensaio em doentes com cancro de mama metastático<sup>43</sup>.

### **Prognóstico**

O valor prognóstico das CTCs foi já documentado em vários estadios de doença, desde localmente avançada até à doença metastática<sup>9,10</sup>, em doentes com cancro de mama, próstata, colorectal, esofágico, entre outros<sup>23</sup>. A deteção de um número igual ou superior a 5 CTCs constitui um fator de pior prognóstico, documentado em doentes com cancro de mama, próstata e cólon<sup>35</sup>. Note-se que foram precisamente estes resultados que conduziram à aprovação da utilização do *CellSearch*® pela FDA. O *timing* em que são colhidas as CTCs poderá também influir na sua capacidade prognóstica, sublinhando-se assim novamente a importância de *standardizar* todo processo pré-clínico<sup>42</sup>.

### Ácidos nucleicos tumorais circulantes

Uma parte significativa dos ácidos nucleicos circulantes em doentes oncológicos corresponde a ctDNA, no qual se detetam alterações genéticas e epigenéticas classicamente descritas em biópsias tecidulares<sup>9,44,45</sup>. Provavelmente este ctDNA tem uma origem diversa, desde a libertação passiva por células tumorais em apoptose ou necrose<sup>9</sup>, até células metastáticas que acabam por sofrer lise espontânea<sup>46</sup>, ou mesmo por secreção ativa por células neoplásicas viáveis doo tumor primário, micrometástases ou metástases já estabelecidas<sup>44,45</sup>. De facto a hipótese da genomastização propõe a indução de novos focos tumorais através da “transfecção” de células saudáveis pelo ctDNA, secretado por células neoplásicas<sup>23,45</sup>. Conhecer a origem do ctDNA não se trata de uma questão de importância menor, uma vez que poderá apenas representar informação genética de células tumorais mais suscetíveis a fenómenos de apoptose e necrose, e por isso de menor viabilidade celular e com menor interesse na tomada de decisões diagnósticas e/ou terapêuticas<sup>47</sup>.

Estima-se que o ctDNA compreenda entre 0,01% e 90% de todo o ADN circulante<sup>48</sup>, sendo o restante provenientes de células saudáveis, libertado em grandes quantidades após cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia<sup>23</sup>. É possível até que esta libertação massiva de ADN não-tumoral contribua para uma “diluição” do ctDNA, diminuindo assim a sua sensibilidade, enquanto biomarcador de diagnóstico<sup>6</sup>. A estas dificuldades acresce ainda a distribuição bifásica de ctDNA<sup>49</sup>, isto é, em diferentes fases da doença parece haver um predomínio de sequências de ctDNA com tamanhos diferentes. Alterações nesta distribuição bifásica parecem estar associadas à progressão da doença<sup>49</sup> e a análise da integridade do ctDNA (análise centrada no tamanho dos fragmentos de ADN detetados) parece ser até mais representativa da progressão tumoral, quando comparada com a análise isolada de valores absolutos<sup>50</sup>.

Os ácidos nucleicos circulantes compreendem ainda outros biomarcadores, como é o caso dos miRNAs<sup>14,51,52</sup>. As primeiras descrições da associação de alterações de miRNAs e cancros “sólidos” surgiram em 2008, nos trabalhos de Mitchell et al<sup>53</sup>. Dentro do grupo de RNAs contamos ainda com os mRNAs<sup>54</sup> e outros RNAs circulantes. Estes últimos ainda se encontram numa fase incipiente da sua investigação, como é o caso dos *small nucleolar RNA (snoRNA)*, *small nuclear RNA (snRNA)*, *piwi-interacting RNA (piRNA)* e dos *long noncoding RNA (lncRNA)*<sup>55</sup>.

### **ADN tumoral circulante - ctDNA**

Existem duas estratégias de análise do ctDNA no contexto das biópsias líquidas:

- Doseamento da quantidade absoluta e análise da integridade de ctDNA;
- Detecção de alterações genéticas associadas a neoplasias, como é o caso de mutações pontuais ou rearranjos cromossómicos;

As alterações genéticas de ctDNA detetáveis incluem mutações pontuais, variações somáticas simples de nucleótidos (*Single Nucleotide Variations* - SNVs), *imbalances* alélicos, rearranjos cromossómicos, instabilidade de microssatélites, perda de heterozigotia, assim como alterações epigenéticas, como é o caso da metilação aberrante<sup>9,44,55</sup>. A deteção destas mutações pode ser feita de uma forma dirigida - pesquisando mutações específicas, em genes conhecidos e descritos em tecido tumoral -, ou de uma forma mais abrangente, sequenciando todo o material genético tumoral isolado. A pesquisa dirigida a mutações com uma relação bem estabelecida em alguns tipos de tumores, como é o caso do *KRAS* no cancro colo-retal, é feita com recurso a técnicas de PCR quantitativo ou digital, assim como técnicas de sequenciação dirigida através da sequenciação de nova geração (*next-generation sequencing* – NGS)<sup>6,44</sup>.

Apesar de a pesquisa dirigida por PCR ou NGS diminuir a sensibilidade de deteção de mutações no ctDNA, esta é uma alternativa menos dispendiosa do que a sequenciação tumoral completa<sup>44</sup>, tornando-a por isso numa análise de maior aplicabilidade prática. Por outro lado, os métodos mais abrangentes permitem a deteção de mutações raras ou até mesmo múltiplas mutações, aumentando assim a sua sensibilidade, quer em termos diagnósticos, quer em termos de capacidade preditiva de resposta à terapêutica<sup>55</sup>.

### **Micro-ARNs – miRNA**

Os miRNAs terão também origem em processos de libertação passiva ou secreção ativa, modulando a expressão genética das células que os recebem<sup>3,56</sup> e favorecendo a formação do nicho pré-metastático<sup>57</sup>, convergindo também na hipótese da genometação. Atualmente já se encontram descritas possíveis influências dos miRNAs na modulação à quimiossensibilidade<sup>58</sup>, bem como na angiogénese ou capacidade celular de invasão tecidual<sup>59-62</sup>.

Ainda não dispomos de ensaios clínicos que demonstrem um papel inequívoco dos miRNAs enquanto biomarcadores. Provavelmente devido à sua expressão variável de doente para doente, mas também aos diferentes métodos utilizados no seu processamento clínico e às diferentes abordagens analíticas e estratégias utilizadas para a normalização dos dados nos vários trabalhos publicados<sup>63</sup>.

### **Rastreio, diagnóstico e estadiamento**

Os valores de ácidos nucleicos circulantes são superiores em indivíduos doentes, comparativamente com controlos saudáveis<sup>64-67</sup> e os níveis de ctDNA diminuem drasticamente após a remoção do tumor, aumentando novamente na recidiva da doença<sup>68</sup>. A concentração de ctDNA na corrente sanguínea tem inclusivamente relevância quantitativa, na medida em que níveis mais elevados estão associados a tumores de maior dimensão, maior grau de invasão tumoral e metastização<sup>45,67</sup>. A capacidade de o *pool* de ctDNA ser influenciado por fenómenos de metastização sugere que este é um biomarcador capaz de discriminar a heterogeneidade tumoral espacial e temporal<sup>44</sup>.



No contexto de doença metastática, o ctDNA parece demonstrar superioridade diagnóstica em relação à biópsia tecidual. No ensaio de fase II SHIVA, para além da análise de ctDNA identificar as mesmas mutações detetadas em biópsias tecidulares de metástases, também forneceu informação acerca de mutações presentes em metástases cuja biópsia foi impossível de obter<sup>69</sup>. Ainda assim é necessária a validação desta hipótese em estudos de maior dimensão, com vista a demonstrar a superioridade do ctDNA sobre as CTCs enquanto marcador de carga tumoral<sup>9</sup>, bem como de substituto da biópsia tecidual quando a amostra é insuficiente.

Em estadios mais precoces será de esperar que existam quantidades mais reduzidas de ctDNA, mais facilmente “diluídas” pelo ADN circulante, pelo que a sua aplicação em rastreio oncológico constitui um objetivo mais desafiante, requerendo técnicas de análise extremamente sensíveis, específicas e reprodutíveis<sup>9</sup>. Ainda assim, de uma maneira geral, a deteção de ctDNA constitui um candidato mais promissor em termos de marcador de rastreio ou diagnóstico precoce, comparativamente com as CTCs, devido à sua maior sensibilidade<sup>42,70</sup>. Para além das concentrações de ctDNA poderem chegar a ser cerca de quinze vezes superiores às de CTCs, já foram descritos casos em que se detetou ctDNA mas não CTCs, não havendo registo da ocorrência do contrário, isto é, deteção de CTCs mas não de ctDNA<sup>71</sup>.

Vários miRNAs foram também já descritos, enquanto biomarcadores de rastreio, diagnóstico e de estadiamento, nomeadamente a família *let-7* (cluster constituído por 13 miRNAs diferentes), família miR-29, familiar miR-30, miR-10b, miR-16, entre outros<sup>3</sup>.

### **Tratamento**

A análise do ctDNA poderá acumular várias funções<sup>44</sup>:

- Capacidade preditiva de resposta a determinado tratamento – Deteção de mutações que conferem suscetibilidade a alguns fármacos;
- Capacidade preditiva de resistência a determinado tratamento – Deteção de mutações que determinam resistência;
- Monitorização da resposta terapêutica – Deteção de níveis residuais de ctDNA após tratamento, traduzindo doença residual mínima, ou alterações tardias que sugiram recidiva;

O melhor exemplo de marcador preditivo de resposta à terapêutica é o da deteção de mutações EGFR pelo teste *cobas EGFR v2*, no contexto de cancro pulmonar. Alterações nas concentrações de alguns miRNAs foram também associados a uma capacidade preditiva de resposta à terapêutica, como é o caso do *cluster* miR-17~92, miR-155, a família miR-200 e o miR-210<sup>3</sup>.

A deteção de mutações que conferem resistência ao tratamento instituído, permite instituir tratamentos mais dirigidos, evitando assim terapêuticas fúteis<sup>9,44</sup>. A deteção deste tipo de mutações foi já demonstrada em vários trabalhos, em doentes com cancro pulmonar, mamário e colo-retal<sup>42</sup>. No caso específico do cancro colo-retal, isto poderá ser importante no seguimento da evolução tumoral em doentes classificados como *KRAS wild type*<sup>23</sup>. As alterações nas concentrações da família miR-125 também se associaram a resistência à quimioterapia<sup>3</sup>.

A concentração de ctDNA desce significativamente após cirurgia e/ou terapêutica citostática<sup>4,67,72,73</sup>. Esta é uma redução quase imediata no caso da cirurgia, mas após terapêutica citostática é precedida por um aumento significativo<sup>44</sup>, provavelmente devido à lesão indiscriminada de células saudáveis e células tumorais.

A identificação de mutações específicas do ctDNA permite o reconhecimento de doença residual mínima, assim como a deteção precoce de recidivas, após a instituição de terapêutica<sup>4,9,44</sup>. Também o doseamento da família miR-29 poderá permitir o reconhecimento precoce de recidivas pós-cirúrgicas<sup>3</sup>. Esta monitorização e deteção precoce de clones celulares resistentes foi demonstrada em casos de leucemia, cancro pulmonar, intestinal e melanoma<sup>74</sup>, permitindo em alguns casos planejar tratamentos combinados, visando diferentes pontos das vias de sinalização celular e assim neutralizar as recidivas<sup>75</sup>. Contudo, é necessário enfatizar a necessidade de desenvolver ensaios clínicos capazes de demonstrar que esta deteção precoce de recidivas e de doença residual mínima tem um impacto direto na sobrevivência.

O doseamento de ctDNA permite detetar recidivas 10 meses mais cedo, comparativamente com o *follow-up* convencional<sup>9,23,44,45</sup>. No entanto existem ainda dificuldades significativas em termos de sensibilidade e especificidade, que devem ser superadas antes que este biomarcador possa ter um impacto clínico importante. Isto porque em fases mais precoces poderá haver mais ADN circulante com origem em células saudáveis do que propriamente ctDNA, e porque podem surgir mutações que estão associadas a cancro, mas que não se traduzem efetivamente em neoplasias<sup>23</sup>. Uma das principais vantagens do ctDNA, enquanto marcador de *follow-up*, reside na possibilidade de ser doseado repetidamente, através de um procedimento minimamente invasivo<sup>4</sup>. A sua curta semi-vida (15 minutos a algumas horas<sup>44,68,76</sup>) permite também que o seguimento destes doentes seja feito em intervalos de tempo mais curtos, comparativamente com os exames imagiológicas e as biópsias tecidulares, que por sua vez nem sempre são de fácil interpretação<sup>4</sup>.

### **Prognóstico**

Concentrações mais elevadas de ctDNA estão associadas a maior carga tumoral, maior agressividade e pior prognóstico em vários tipos de neoplasia, desde linfomas Hodgkin e não-Hodgkin<sup>77,78</sup>, até ao cancro de mama<sup>79</sup>. Alguns trabalhos em cancro de mama e colo-retal demonstraram que a deteção de valores mais elevados de ctDNA, após a realização de cirurgia, associava-se a uma maior probabilidade de recidiva<sup>68,80</sup>. Vários miRNAs foram também já descritos enquanto marcadores de prognóstico, de entre os quais se incluem a família let-7, o cluster miR-17~92, entre outros<sup>3</sup>.

### **Fontes de biópsias líquidas**

A pesquisa de biomarcadores iniciou-se em 1848, através da deteção de cadeias leves de imunoglobulina na urina, em doentes com mieloma múltiplo<sup>81</sup>. Atualmente já se encontram descritos marcadores detetáveis em amostras de sangue periférico, saliva, lágrimas, lavado brônquico, líquido amniótico, pleural e peritoneal, entre outros<sup>13,19,24</sup>. A origem de cada um destes fluídos apresenta uma relação estreita com o tipo de tumor em estudo, como é o caso dos miRNAs do fluído seminal no cancro da próstata ou do líquido cefalo-raquidiano em glioblastomas<sup>3</sup>.

A saliva apresenta-se como uma fonte promissora de biópsias líquidas, uma vez que é facilmente obtida por métodos não-invasivos, pode ser colhida várias vezes e dispensa o recurso a equipamento especial para a sua colheita e armazenamento<sup>19</sup>. A presença de alguns biomarcadores, como os miRNAs, parece até ser significativamente mais elevada em amostras de saliva<sup>24</sup>. Ao nível gastrointestinal, o cancro do pâncreas, esofágico e gástrico são os que apresentam maior investigação<sup>19</sup>. É possível detetar ctDNAs (mRNA), miRNAs, exossomas, mas não CTCs. Adicionalmente existem alguns trabalhos que descrevem a pesquisa de metabolitos e microbiota que poderá ter um papel importante enquanto marcador diagnóstico<sup>19</sup>.

## Cancro esofágico

O cancro esofágico é frequentemente diagnosticado em estadios mais avançados, nos quais a sobrevivência ao fim de 5 anos acaba por não ultrapassar os 3%<sup>82</sup>, pelo que a adoção de novos métodos de rastreio e diagnóstico precoce assume especial relevância.

No caso do adenocarcinoma esofágico, atualmente apenas conseguimos avaliar o risco de progressão das lesões de esófago de Barret para adenocarcinoma recorrendo a biópsias endoscópicas seriadas, que para além de implicarem procedimentos invasivos, estão também sujeitas à variabilidade inter-observador, a erros de amostragem, bem como a alguma heterogeneidade displásica que dificulta a determinação da probabilidade de progressão<sup>82</sup>.

De acordo com o sistema de estadiamento da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), para além das biópsias tecidulares é também necessário recorrer a exames de imagem, para que se obtenha um estadiamento completo<sup>83</sup>. Com o objetivo de melhorar a precisão diagnóstica e de estadiamento, a AJCC incorporou agora uma nova categoria na classificação TNM - M0(i+) -, que basicamente se traduz na presença de depósitos de células tumorais detetadas molecular ou microscopicamente na circulação, medula óssea ou tecidos ganglionares, com um diâmetro inferior a 0,2 mm, num doente sem sintomas ou sinais de metastização<sup>82,83</sup>. Evidencia-se assim a antecipação da AJCC ao que será provavelmente o futuro da prática da oncologia, bem como o contributo das CTCs, quer como ferramenta de diagnóstico precoce, quer como fonte de informação adicional para o estadiamento.

### Células tumorais circulantes

Comparativamente com outros cancros, a investigação em CTCs no cancro esofágico tem-se revelado mais comedida<sup>84</sup>. Existem alguns estudos preliminares que documentam alterações de CTCs enquanto fator independente de prognóstico no carcinoma pavimentoso e adenocarcinoma<sup>82</sup>, mas foram os trabalhos de Reeh et al que mais recentemente estabeleceram evidência convincente desse mesmo potencial<sup>85</sup>. Num estudo que envolveu 100 doentes com tumores cirurgicamente ressecáveis, concluiu-se que a deteção pré-operatória de uma ou mais CTCs (em doença aparentemente não-metastizada) estava associada a uma menor sobrevivência geral e a um menor tempo até recorrência de doença. Verificou-se ainda alguma tendência para se detetar mais facilmente CTCs em adenocarcinomas, comparativamente com carcinomas pavimentosos – possivelmente porque a expressão antigénica dos primeiros é mais passível de ser reconhecida pelo sistema *CellSearch*<sup>®82</sup>. Precisamente por esse motivo Gallerani et al reforçam a importância de a deteção CTCs não se basear apenas na pesquisa do EpCAM, uma vez que este é um método que subestima a verdadeira carga de células tumorais circulantes e células tumorais disseminadas<sup>82</sup>. Numa meta-análise de 2015, Qiao et al demonstraram que a presença de CTCs se associava significativamente a estadiamento TMN mais avançado, invasão venosa, metastização ganglionar e, consequentemente, a um pior prognóstico em doentes com carcinoma pavimentoso,<sup>86</sup>

Num trabalho mais recente, Li et al recorreram a uma metodologia de isolamento de CTCs diferente do *CellSearch*<sup>®84</sup>. Em 140 doentes com carcinoma pavimentoso, 62 apresentavam CTCs (44%) e tinham também uma menor sobrevivência geral, bem como um menor tempo de sobrevivência livre de doença. Adicionalmente verificou-se que a presença de CTCs parecia tornar-se mais significativa em doentes com estadios mais avançados, demonstrando assim o seu papel no estadiamento.

## Ácidos nucleicos tumorais circulantes

### **Diagnóstico e estadiamento**

Através do doseamento de ctDNA, Lan et al conseguiram distinguir doentes com cancro esofágico, gástrico e colo-retal de controlos saudáveis e, diferentes concentrações deste biomarcador, permitiram também diferenciar situações de carcinoma *in situ* de doença em estadio mais avançado<sup>87</sup>, evidenciando assim as potencialidades do ctDNA enquanto marcador diagnóstico e de estadiamento. De entre estes três tipos de tumores, o cancro esofágico apresentava valores mais elevados de ctDNA. Porém, esta diferença poderá ter tido origem nos diferentes estadios que os doentes analisados apresentavam. Também Hsieh et al descreveram diferentes concentrações de ctDNA que permitiam distinguir doentes com carcinoma esofágico pavimentoso de controlos saudáveis<sup>88</sup>. Ueda et al acrescentam que, através da monitorização dos níveis de ctDNA em carcinoma esofágico pavimentoso, é possível determinar a carga de patologia tumoral em cada doente<sup>89</sup>. Numa meta-análise realizada previamente aos resultados anteriormente apresentados, Vaart et al obtiveram resultados inconsistentes, referindo ainda que seria necessário obter mais informações acerca da origem, função e relevância da presença de ctDNA em circulação<sup>90</sup>. Talvez seja agora necessário proceder a uma nova revisão da literatura científica, com vista a determinar se estes novos resultados corroboram com a hipótese da utilização de ctDNA enquanto biomarcador diagnóstico.

Para além da deteção propriamente dita de ctDNA, a pesquisa de alterações epigenéticas poderá ser útil no diagnóstico precoce e deteção de recidivas no cancro esofágico<sup>46</sup>. Kawakami et al demonstraram que a hipermetilação do gene *APC* parece ter uma incidência superior em doentes com adenocarcinoma, comparativamente com o carcinoma pavimentoso<sup>91</sup>. Foram ainda descritas outras alterações epigenéticas capazes de identificar doentes com carcinoma esofágico, como é o caso da metilação dos promotores dos genes *p16*, *SFRP-1*, *WIF-1*, *DKK-3* e *RUNX-3*<sup>92,93</sup>. A deteção de marcadores de microssatélites também poderá contribuir para a identificação destes doentes, como é o caso dos que se localizam nos cromossomas 9p (*p16*), 17p (*p53*) e 5q (gene *APC*), uma vez que em 96,4% de casos de doentes com carcinoma esofágico pelo menos uma alteração num destes marcadores foi detetada<sup>94</sup>.

Comparando soro e plasma de doentes com carcinoma esofágico pavimentoso e controlos saudáveis, vários miRNAs demonstraram potencial diagnóstico - nomeadamente o miR-10a, miR-18a, miR-21, miR-22, miR-25, miR-100, miR-127-3p, miR-133a, miR-148b, miR-155, miR-223, miR-375, miR-718 e o miR-1246<sup>95-101</sup>. Sete destes miRNAs (miR-10a, miR-22, miR-100, miR-127-3p, miR-133a, miR-148b e miR-223) demonstraram ainda uma capacidade diagnóstica superior ao do CEA<sup>95</sup>. O miR-21 demonstrou ainda associação com invasão vascular e recorrência de doença<sup>99</sup>, o miR-1246 associou-se a profundidade tumoral, metastização ganglionar e à distância e o miRNA-718 com a metastização ganglionar<sup>101</sup>.

No que diz respeito ao diagnóstico do adenocarcinoma esofágico, a exploração dos miRNAs exossomais poderá ser mais vantajosa<sup>56</sup>, sobretudo numa pesquisa de um painel de miRNAs, em vez de miRNAs isolados – RNU6-1/miR-16-5p/miR-25-3p/miR-320a/let-7e-5p/miR-15b-5p/miR-30a-5p/miR-324-5p/miR-17-5p/miR-194-5p – que já demonstrou ser capaz de distinguir doentes com adenocarcinoma de controlos saudáveis e de doentes com esófago de Barret<sup>102</sup>.

Em amostras de saliva foram já publicados vários trabalhos que identificaram o potencial diagnóstico de alguns miRNAs, como é o caso do miR-10b, miR-21, miR-144, miR-451, miR-486-5p e miR-634<sup>19</sup>.

### ***Tratamento e prognóstico***

Níveis mais elevados de ctDNA parecem estar associados com uma maior invasão linfovascular e, consequentemente, com uma maior probabilidade de recidiva pós-operatória de cancro esofágico, de acordo com os resultados apresentados por Hsieh et al<sup>88</sup>.

Apesar ser um trabalho com um número reduzido de doentes, Ueda et al demonstraram ainda que a deteção de ctDNA em recidivas tumorais de carcinoma esofágico pavimentoso poderá inclusive preceder a deteção por exames de imagem, em até cerca de 6 meses<sup>89</sup>, assim como também permite uma deteção mais precoce comparativamente com o CEA<sup>103</sup>. Estes resultados confirmam aquilo que outros autores previamente já tinham descrito<sup>104–106</sup>.

A deteção da amplificação de genes como o CCND1 em ctDNA poderá ajudar identificar doentes com carcinoma esofágico pavimentoso, bem como detetar precocemente recidivas após a implementação de terapêutica cirúrgica, tal como foi demonstrado por Komatsu et al<sup>107</sup>.

O miR-718 encontra-se em níveis mais reduzidos em doentes com carcinoma pavimentoso, comparativamente com controlos saudáveis, aumentando no pós-operatório dos primeiros<sup>101</sup>. Quer isto dizer que pode ser usado tanto em termos diagnósticos, como no seguimento dos doentes submetidos a tratamento cirúrgico, apesar de ter uma dinâmica pouco comum neste tipo de marcadores, diminuindo na presença de doença e aumentando após a instituição de terapêutica. O miR-375 apresenta uma cinética semelhante ao miR-718, aumentando no período pós-operatório – precisamente por esse motivo, níveis mais baixos no pós-operatório foram associados a menor sobrevivência, assim como níveis elevados de miR-21<sup>108</sup>.

Níveis elevados de miR-27a, miR-27b e miR-200c foram associados a menores respostas à quimioterapia pré-operatória baseada em cisplatina, no tratamento do carcinoma pavimentoso<sup>109,110</sup>. Em esquemas de quimioterapia neoadjuvante à base de cisplatina o miR-200c também pode ser usado como marcador de resposta à terapêutica<sup>110</sup>. O miR-21 foi descrito como sendo um miRNA promotor de quimiorresistência, em regimes de cisplatina e 5-fluorouracilo<sup>111</sup>.

Numa análise a vários miRNAs, provenientes de doentes com adenocarcinoma esofágico submetidos terapêutica neoadjuvante, Odenthal et al identificaram 2 biomarcadores que se correlacionaram com a sobrevivência geral – miR-222 e miR-302c<sup>112</sup>.

Provavelmente pela associação do miR-1246 com invasão e metastização tumoral, alguns autores descrevem-no também como um marcador prognóstico<sup>100</sup>. Também o miR-16 e o miR-21 estão associados a uma menor sobrevivência livre de doença e a uma menor sobrevivência geral<sup>113</sup>.

## Cancro gástrico

O cancro gástrico ocupa a quinta oposição em termos de mortalidade em todo o mundo por patologia oncológica<sup>114</sup>, constatando-se menores taxas de sobrevivência à medida que a doença progride no seu estadiamento<sup>115</sup>. Evidencia-se assim a importância do desenvolvimento de técnicas de diagnóstico precoce, assim como metodologias de menor invasividade (comparativamente com a endoscopia digestiva alta), que aumentem a receptividade do próprio doente à investigação diagnóstica<sup>116</sup>.

Para além dos CTCs, ctDNAs e microRNAs, existem vários outros tipos de biomarcadores investigados em doentes com cancro gástrico - proteínas circulantes, auto-anticorpos associados ao tumor, lncRNAs, piRNAs e DNA mitocondrial<sup>116</sup>. Contudo, tal como advertido anteriormente, esta revisão focar-se-á apenas nos três primeiros.

### Células tumorais circulantes

Os trabalhos realizados em CTCs no cancro gástrico destacam-se pelo seu valor no rastreio e de capacidade preditiva prognóstica. Numa revisão sistemática e respetiva meta-análise, Tang et al. concluíram que, apesar de a deteção de CTCs apresentar uma baixa sensibilidade para o diagnóstico de cancro gástrico (42%), e por isso não ser recomendável a sua utilização isolada em procedimentos de rastreio, a sua elevada especificidade (99%) confere-lhe valor enquanto exame de exclusão diagnóstica<sup>117</sup>. Valores mais elevados de CTCs também parecem correlacionar-se com uma menor sobrevivência geral, maior incidência de recorrência, períodos livres de doença mais curtos, bem como doença mais avançada, com menor grau de diferenciação e disseminação linfática<sup>116</sup>. Contudo, salienta-se ainda a necessidade de um maior refinamento dos métodos de isolamento de CTCs, para que possam então passar a ser usados na prática clínica<sup>116</sup>.

### Ácidos nucleicos tumorais circulantes

A divisão desta revisão em marcadores obtidos por CTCs, ctNAs e outros biomarcadores não é absolutamente estanque, uma vez que, por exemplo, os ctNAs detetados podem ter origem em CTCs ou exossomas. Este problema coloca-se sobretudo na discussão do cancro gástrico, uma vez que vários autores discutem o doseamento de ctNAs, enquanto marcadores da presença de CTCs. Contudo, por uma questão de simplificação, optei por incluir os dados obtidos em ctNAs na discussão apenas dedicada a este tipo de marcadores, independentemente de os autores os considerarem provenientes de CTCs ou não.

### ***Rastreio, diagnóstico e estadiamento***

No cancro gástrico o ctDNA demonstra essencialmente potencial em termos de diagnóstico, uma vez que vários trabalhos demonstraram conseguir discriminar entre doentes e controlos saudáveis, com base em valores aumentado destes biomarcadores<sup>118,119</sup>. O próprio padrão de metilação do ctDNA poderá permitir a distinção entre doentes e controlos saudáveis, através da metilação de genes como o BX141696, WT1, CYP26B1, KCNA4, SOX17, Runx3 e o p15<sup>120-123</sup>.

Novamente em estudos de comparação entre o plasma de doentes com indivíduos-controlo saudáveis, vários miRNAs demonstram potencial diagnóstico, como é o caso do miR-16, miR-17-5p, miR-18a, miR-19b, miR-21, miR-25, miR-27a, miR-92a, miR-106a, miR-106b, miR-122, miR-141, miR-192, miR-194, miR-199a, miR-200c, miR-222, miR-223, miR-378, miR-421, miR-451, miR-486, miR-486-5p, miR-940 e miR-1233<sup>56,116,124-127</sup>. De referir ainda o rácio miR-106a/let-7a, estabelecido por Tsujiura et al., que apresenta uma sensibilidade e especificidade de 85,5% e 80%, respetivamente, para a distinção entre doentes com cancro gástrico e controlos saudáveis.

Em termos de estadiamento, o miR-203 apresentou níveis de expressão mais reduzidos quanto mais avançada era a doença, sendo mais baixo em estadio IV, comparativamente com I-III, assim como também se encontrava em níveis mais baixo em indivíduos com metastização ganglionar, peritoneal e à distância<sup>56</sup>.

### **Terapêutica**

Kim et al demonstraram que, após a implementação de terapêutica cirúrgica, surge uma redução significativa nos valores de ctDNA<sup>119</sup>, evidenciando assim a potencial enquanto marcador de seguimento. Note-se, contudo, que este é apenas um estudo caso-controlo, sendo por isso desejável a acumulação de evidência científica em maior quantidade e robustez.

A utilização conjunta do miR-142-5p e do miR-375 demonstraram capacidade de prever o risco de recorrência em doentes com cancro gástrico, submetidos a terapêutica cirúrgica<sup>128</sup>.

### **Prognóstico**

Vários miRNAs apresentaram correlação com uma menor sobrevivência geral, sendo por isso identificados como marcadores prognósticos, de entre os quais o miR-18a, miR-21, miR-27a, miR-200c, miR-203 e o miR-222<sup>56,116,129-133</sup>. No caso específico do miR-203, níveis mais baixos parecem estar associados a pior prognóstico, com maior potencial de invasão e metastização<sup>129</sup>.

## Cancro pancreático

As biópsias líquidas e as suas potencialidades diagnósticas, de *follow-up* e de capacidade prognóstica também poderão ter um impacto significativo em doentes com cancro pancreático. Trata-se de uma patologia com uma taxa de sobrevivência a 5 anos de aproximadamente 5%<sup>134</sup>, que se deve essencialmente ao facto de ser diagnosticada em estadios mais tardios<sup>135</sup>, mas também à sua localização anatómica, que dificulta a obtenção de biópsias tecidulares, quer por ser um local de difícil acesso, quer pelas potenciais complicações cirúrgicas ou até mesmo pela disseminação tumoral<sup>136,137</sup>. Embora alguns autores afirmem que o risco de disseminação é reduzido, esta é uma biópsia obtida por via eco-endoscópica através do duodeno e frequentemente apresenta um elevado conteúdo estromal<sup>138</sup>, que acaba por dificultar a obtenção de um diagnóstico histológico..

O marcador sérico CA19-9 tem utilidade na monitorização da resposta ao tratamento, mas a reduzida especificidade compromete a sua utilização diagnóstica<sup>137</sup>, pelo que é necessário investir noutros biomarcadores, como as CTCs ou o ctDNA.

### Células tumorais circulantes

#### **Rastreio e diagnóstico precoce**

A evolução genética do cancro pancreático tem um período de desenvolvimento de cerca de 20 anos<sup>139</sup>, criando-se assim uma vasta janela de oportunidade diagnóstica. De facto, Rhim et al. descreveram já a possibilidade de se isolar CTCs em fases bastante precoces da doença, durante as quais apenas se detetam neoplasmas mucinosos papilares intraductais (*intraductal papillary mucinous neoplasm* – IPMN) ou neoplasmas císticos mucinosos (*mucinous cystic neoplasm* – MCN)<sup>140</sup>, lesões estas consideradas como pré-malignas<sup>135</sup>.

Ainda assim é necessário investir na procura de um método de deteção de CTCs com maior sensibilidade e especificidade, no contexto do cancro pancreático<sup>136</sup>, uma vez que a sensibilidade do *CellSearch*® não vai além dos 11% para doença localizada e avançada, e dos 19% para doença metastática<sup>141,142</sup>. Apontam-se várias explicações para estes valores<sup>36,143,144</sup>:

- As CTCs ficam aprisionadas no fígado após atravessarem a circulação portal. Os resultados apresentados por Bissolati et al corroboram com esta hipótese<sup>145</sup>;
- Há uma diminuição do fluxo sanguíneo intra-pancreático em 60%, nos casos de tumores malignos pancreáticos, quando comparados com tecidos pancreáticos normais;
- O próprio processo de transição epitélio-mesenquimatoso impede que sejam detetáveis pelos marcadores utilizados no *CellSearch*®;

Outras plataformas de isolamento, como o Immuno-FISH ou a filtração por tamanho apresentam resultados mais animadores, que vão desde 73 até 100% de sensibilidade<sup>146,147</sup>, permitindo mesmo, no caso da filtração por tamanho das CTCs, a pesquisa de mutações no DNA presente no seu interior<sup>136</sup>.

#### **Tratamento**

Ao fim de uma semana após o início de quimioterapia com 5-fluorouracilo, Ren et al documentaram uma diminuição significativa dos níveis de CTCs<sup>148</sup>, sugerindo assim um possível papel das CTCs enquanto marcador de resposta à terapêutica sistémica.



## **Prognóstico**

Apesar da reduzida sensibilidade das CTCs no diagnóstico precoce de cancro pancreático, vários estudos demonstraram que, quando são detetadas, estão associadas a um maior risco de recidiva e/ou pior prognóstico<sup>55</sup>. De facto, duas meta-análises realizadas até à data demonstraram a associação entre a presença de CTCs e um pior prognóstico, com menor intervalo livre de recorrências e menor sobrevivência global<sup>149,150</sup>.

## **Ácidos nucleicos tumorais circulantes**

### **Rastreio e diagnóstico**

O cancro pancreático foi a primeira patologia neoplásica a ser associada a níveis elevados de ctDNA<sup>67</sup>. Estima-se que possa ser detetado em cerca de 50% dos doentes com cancro pancreático em estadios precoces<sup>151</sup>, mas os vários autores referem ainda a necessidade de encontrar mutações genéticas específicas que possam aumentar a sensibilidade da utilização do ctDNA, enquanto biomarcador diagnóstico precoce<sup>136</sup>. Vasen et al demonstraram alguma vantagem na pesquisa de mutações do CDKN2A, durante o rastreio de indivíduos com cancro pancreático<sup>152</sup>, mas é ainda necessário que estes resultados sejam replicados e confirmados, pois vários outros estudos não conseguiram identificar um outro método de rastreio fiável, com recurso a ctDNA<sup>138</sup>.

A deteção de mutações no gene KRAS em tecido tumoral permite chegar ao diagnóstico definitivo de adenocarcinoma pancreático<sup>153</sup>, pelo que este se torna um dos principais candidatos neste tipo de pesquisa. De facto vários trabalhos foram publicados acerca da deteção de mutações do KRAS, através de ctDNA obtido em doentes com cancro pancreático, mas as sensibilidades descritas variam desde 29,2 até 81,7%<sup>154,155</sup>. A concordância entre biópsias líquidas e tecidulares é de cerca de 77-90%, demonstrando assim a fiabilidade do ctDNA enquanto método diagnóstico<sup>156,157</sup>.

Tal como no cancro esofágico e no cancro gástrico, o estudo dos miRNAs enquanto biomarcadores de cancro pancreático tem demonstrado ser bastante promissor. Atualmente contamos já com mais de 30 tipos de miRNAs como candidatos a biomarcadores de cancro pancreático<sup>55</sup>, sobretudo com potencial de diagnóstico e estadiamento<sup>158</sup>. O miR-223 isolado a partir do plasma apresenta potencial enquanto marcador de rastreio de cancro pancreático<sup>56</sup>, assim como o miR-1290 que demonstrou ter uma capacidade discriminatória entre doentes com cancro pancreático de estadios precoces e indivíduos-controlo superior à do CA19-9<sup>159</sup>.

Existem vários mi-RNAs presentes no sangue periférico que poderão ajudar a distinguir indivíduos saudáveis de doentes com cancro pancreático, bem como discriminar os vários estadios de doença, como é o caso do miR-16, miR-18a, miR-20a, miR-21, miR-22, miR-24, miR-25, miR-27a, miR-27a-3p, miR-31, miR99a, miR-155, miR-185, miR-191, miR-196a, miR-203, miR-205, miR-200a, miR-200b, miR-210, miR-214, miR-374, miR-483, miR-492, miR-642b, miR-885-5p, miR-1246, miR-1290, miR-1427, miR-3976, miR-4306 e o miR-4644<sup>19,56,160,161</sup>. No caso específico do miR-21, este poderá ter utilidade para distinguir entre adenocarcinoma pancreático ductal e pancreatite crónica e indivíduos saudáveis, enquanto o miR-196a facilitaria o diagnóstico diferencial entre doentes – com adenocarcinoma ductal ou pancreatite crónica –, de indivíduos saudáveis<sup>56</sup>.

Através da análise de amostras de saliva também é possível detetar padrões de expressão de miRNA, que permitem discriminar entre indivíduos com cancro pancreático e controlos saudáveis ou com tumores pancreáticos benignos. Os miRNAs implicados são miR-17, miR-21, miR-23a, miR-23b, miR-29c, miR-181a, miR-196a, miR-210, miR-216, miR-940 e miR-3679-5p<sup>19</sup>.

Para além do seu papel diagnóstico, o miR-196a pode ainda ser usado no estadiamento e como marcador prognóstico em doentes com adenocarcinoma pancreático ductal, uma vez que os seus níveis podem ajudar a diferenciar indivíduos em estadios ressecáveis (I e II), de doentes em estadios irresecáveis (III e IV), bem como também têm potencial preditivo para o tempo de sobrevivência médio<sup>56</sup>. Níveis elevados de miR-221 correlaciona-se com a metastização à distância e estadios irresecáveis<sup>162</sup>.

Mais recentemente Schultz et al descreveram a elevada sensibilidade e especificidade diagnóstica da utilização de dois painéis de miRNAs<sup>163</sup>:

- miR-145, miR-150, miR-223 e miR-636;
- miR-26b, miR-34a, miR-122, miR-126, miR-145, miR-150, miR-223, miR-505, miR-636 e miR-885.5p;

### **Tratamento**

A deteção pós-cirúrgica de ctDNA demonstrou estar relacionada com uma maior recidiva tumoral, sendo que esta deteção ocorreu cerca de 6,5 meses mais cedo do que as alterações à TAC<sup>151</sup>.

Níveis elevados de miR-744 foram descritos como induzindo quimiorresistência à gemcitabina *in vitro*, pelo que no futuro este biomarcador poderá ter utilidade, em termos de capacidade preditiva de resposta ao tratamento<sup>164</sup>.

### **Prognóstico**

Alguns trabalhos demonstram uma associação entre a deteção de mutações KRAS no plasma e no soro, com uma sobrevida inferior e estadios mais avançados em doentes com carcinoma pancreático ductal<sup>156,165,166</sup>.

Dentre os vários miRNAs com valor prognóstico no cancro pancreático, destacam-se o miR-21, miR-196a, miR-221 e o miR-744<sup>56</sup>, estando estes associados a menor sobrevivência global.

## Cancro colo-retal

O rastreio oportunístico do cancro colo-retal é recomendado em vários países<sup>167</sup>, sendo a colonoscopia um dos meios diagnósticos mais recomendados também<sup>16</sup>, ilustrando novamente o potencial contributo de técnicas diagnósticas de menor invasividade, como é o caso das biópsias líquidas.

A utilização de marcadores séricos como o CEA e o CA15.5 poderão ser utilizados neste contexto, mas são essencialmente ferramentas de *follow-up* devido à sua reduzida especificidade<sup>168</sup>.

### Células tumorais circulantes

#### **Estadiamento, tratamento e prognóstico**

De todos os tumores abordados neste trabalho, o cancro do cólon é o único para o qual existe já uma aprovação da FDA – *CellSearch*® -, para além do cancro da mama e da próstata<sup>169–171</sup>. No que concerne ao cancro do cólon metastático, a deteção através do *CellSearch*® demonstrou ser um fator preditivo independente de menor sobrevivência livre de doença e sobrevivência geral<sup>171</sup>. A associação entre CTCs e pior prognóstico foi também já documentada através de várias meta-análises<sup>172,173</sup>.

A deteção de CTCs poderá também ser particularmente útil em doentes com cancro colo-retal de estadio precoce, quando são submetidos a intervenções cirúrgicas de intuito curativo. Atualmente sabemos que 20-30% destes doentes acabam por sofrer recidivas locais ou metastáticas da doença num período de 5 anos<sup>174</sup>. A identificação deste grupo de risco para recidiva poderá ser feita através da deteção de CTCs em contexto pós-operatório<sup>175–177</sup>, podendo assim estabelecer um estadiamento mais preciso e dirigir uma terapêutica adjuvante mais adequada, com vista ao controlo da doença. De facto existem já alguns trabalhos que demonstram a possibilidade de detetar CTCs em cerca de 20-33% dos doentes submetidos a intervenções cirúrgicas de intuito curativo<sup>178,179</sup>, ou seja, uma percentagem similar à de doentes que acabam por sofrer recidivas a longo prazo. A deteção de doença recidivante através da análise dos CTCs poderá inclusive preceder em cerca de 6 meses os resultados positivos obtidos a partir do doseamento do CEA<sup>180</sup>.

As CTCs também poderão ser importantes no estadiamento mais preciso de doença mais avançada, como é o caso do estadio III, uma vez que a sua deteção permite identificar doença com micrometástases em órgãos distantes, independentemente de marcadores de estadiamento como a invasão de gânglios linfáticos<sup>174</sup>. Resultados similares demonstram que, em doença de estadio III, a deteção de CTCs parece correlacionar-se com uma menor sobrevivência livre de doença<sup>178</sup>.

Mesmo em doentes submetidos a terapêutica quimioadjuvante, as CTCs poderão ter um papel importante na definição do esquema terapêutico a adotar. Em doença de estadio III, a deteção de CTCs após um esquema com oxaliplatina, fluorouracilo e ácido folínico permite definir um subgrupo de doentes com períodos mais curtos de sobrevivência livre de doença<sup>181</sup>. Curiosamente estes doentes parecem poder beneficiar da administração de um outro esquema de quimioterapia, composto por 4 fármacos<sup>182</sup>.

Note-se, contudo, que nem todos os doentes com CTCs positivas acabam por progredir, bem como alguns doentes CTCs negativos apresentam progressão<sup>174</sup>. Reforça-se assim a necessidade investigações futuras, que melhorem a sensibilidade e especificidade da deteção de CTCs. Alguns autores argumentam que o aumento da sensibilidade deverá passar pela utilização de métodos de deteção e isolamento de células tumorais estaminais circulantes especificamente, em vez de células tumorais circulantes como um todo<sup>174</sup>.

Na doença colo-retal metastática, o estado mutacional do *KRAS* pode ser determinado a partir de CTCs, ajudando assim a definir o grupo de doentes que poderá beneficiar da terapêutica com cetuximab ou outros anticorpos anti-EGFR<sup>23,183</sup>. Uma meta-análise recente demonstrou que poderá haver discordância, em termos de mutação do *KRAS*, entre o tumor primário e as CTCs<sup>184</sup>. Cerca de 11% dos doentes com mutações *KRAS* no tumor primário apresentavam CTCs com um gene *KRAS wild type* (ou seja, sem mutação), enquanto 9% dos doentes com *KRAS wild type* apresentavam CTCs com mutação *KRAS*. No caso dos tumores primários com *KRAS wild type*, e por isso submetidos a terapêutica dirigida com anti-EGFR, a presença de CTCs com *KRAS* mutado poderá servir como um indicador de precoce de uma futura recidiva tumoral, devido à aquisição de resistência à terapêutica implementada<sup>185</sup>.

### Ácidos nucleicos tumorais circulantes

#### **Rastreio e diagnóstico precoce**

Os níveis de ctDNA parecem ser superiores em doentes com cancro colo-retal, comparativamente com indivíduos controlos<sup>186-198</sup>, evidenciando assim o potencial diagnóstico deste biomarcador. A deteção de ctDNA em doentes de alto risco (com >50 anos, submetidos a colonoscopia após um resultado positivo na pesquisa de sangue oculto na fezes) permite identificar com uma precisão satisfatória indivíduos que apresentam lesões neoplásicas, do tipo adenocarcinoma - por outro lado, a deteção de mutações no *KRAS* apresenta uma sensibilidade e especificidade bastante baixas, podendo inclusive ser detetadas em indivíduos com doença inflamatória intestinal<sup>199</sup>.

Em termos de deteção de miRNAs, o cancro colo-retal apresenta a particularidade de, ao contrário do que acontece com a generalidade dos cancros, a pesquisa em soro parecer ter resultados mais fiáveis do que a pesquisa em plasma<sup>200</sup>. O diagnóstico precoce de cancro colo-retal poderá apoiar-se na deteção da sobreexpressão de miR-17-3p, miR-20a, miR-21, miR-92a e do miR-195, enquanto marcadores da presença de neoplasia<sup>201-204</sup>. O miR-21 é descrito como sendo um marcador de rastreio, apresentando também correlação direta com o tamanho do tumor<sup>14</sup>. O valor diagnóstico do miR-20a e do miR-195 foi já atestado através de uma meta-análise<sup>205</sup>.

O miR-24, miR-320a e miR-423-5p são marcadores úteis no diagnóstico diferencial com doença inflamatória intestinal, uma vez que a sua expressão encontra-se diminuída no cancro colo-retal, mas em demasia na doença inflamatória intestinal<sup>206</sup>. A deteção de miR-92a também poderá ser útil no diagnóstico diferencial com outros cancros gastrointestinais ou doenças inflamatórias intestinais<sup>56</sup>. A deteção de miRNAs em amostras de fezes também parece ser capaz de discriminar entre doentes e controlos saudáveis, através do doseamento do miR-16, miR-21, miR-29, miR-106a, miR-125b, miR-126, miR-135b, miR-143, miR-145, miR-223, miR-224, miR-320 e o miR-484-5p<sup>207-210</sup>. Tanto o miR-18a como o miR-221 parecem aumentar de acordo com a progressão do tumor<sup>211</sup>.

### **Estadiamento e prognóstico**

Reinert et al demonstraram que a deteção de ctDNA permite identificar, com quase 100% de sensibilidade e especificidade, doentes que sofreram recidivas da doença após a cirurgia, com uma antecedência de cerca de 10 meses<sup>212</sup>. Mesmo em doentes com estadio II, no qual é mais difícil definir a probabilidade de recidiva, a deteção de ctDNA enquanto fator de risco para a recidiva foi já definida<sup>213</sup>. A deteção de ctDNA em doentes submetidos a metástectomia de implantes hepáticos também permite identificar casos de recidiva, inclusive mais precocemente do que o CEA ou os métodos imagiológicos<sup>214</sup>.

De uma maneira geral, níveis mais elevados de ctDNA parecem associar-se a estadios de maior agressividade<sup>71,186,194,215,216</sup>, e por isso de pior prognóstico, com menor sobrevivência livre de progressão de doença, bem como uma menor sobrevivência geral<sup>71,217,218</sup>. Para além dos níveis elevados de ctDNA, a presença de níveis elevados de mutações específicas e o nível de fragmentação do ctDNA também servem enquanto fatores de prognóstico, estando associados uma menor sobrevivência geral<sup>219</sup>.

A deteção de mutações que conferem um pior prognóstico, para além das mutações do *KRAS*, também é possível através do ctDNA, como é o caso das mutações do *BRAF*, *NRAS*, *EGFR* e *PIK3CA*<sup>214,220,221</sup>. Alguns autores descrevem ainda a possibilidade de se detetar outras alterações genéticas associadas a progressão da doença, para além das mutações mais pesquisadas, como é o caso da amplificação do genes *KRAS*, também associada a resistência ao tratamento anti-EGFR<sup>222</sup>.

Alguns miRNA apresentam relação com o estadiamento TNM, como é o caso do já descrito miR-21, assim como do miR-193a-3p, miR-23a e miR-338-5p<sup>14</sup>. Os miR-126 e miR141 foram associados com a deteção precoce de metastização hepática<sup>202</sup>. O miR-141 poderá ter maior utilidade, se utilizado como complemento do CEA, na deteção de metastização à distância<sup>56</sup>.

A sobreexpressão de miR-21 também foi descrita como um fator de prognóstico independente<sup>201</sup>. Já os miR-146a, miR-30b, miR-30c, miR-885-5p e miR-30d encontram-se subexpressos no adenocarcinoma do cólon avançado, quando associados a um mau prognóstico<sup>223,224</sup>. A elevada expressão de miR-141 e miR-203 também foi associada a um pior prognóstico<sup>56</sup>.

A pesquisa de um painel de seis miRNAs (miR-15a, miR-103, miR-148a, miR-320a, miR-451 e miR-596) poderá ter valor preditivo em termos de risco de recorrência de cancro de cólon de estadio precoce, à altura do diagnóstico<sup>56</sup>.

### **Monitorização da resposta à terapêutica**

Em alguns tumores colo-retais é possível detetar a presença de mutações no gene *KRAS*, que geralmente traduzem-se em pior prognóstico e resistência ao tratamento dirigido com cetuximab e panitumumab<sup>4</sup>. Através da pesquisa destas mutações em ctDNA é possível identificar doentes com pior prognóstico<sup>44</sup>. A deteção do estado mutacional do gene *KRAS* poderá ser determinado através do ctDNA, tendo em conta a elevada taxa de concordância na deteção de mutações através de amostras tecidulares (tumor primário) e sanguíneas (ctDNA)<sup>183,214,225-230</sup>.

Não obstante, cerca de 10% dos doentes com tumores *KRAS wild type* originam implantes metastáticos com mutação *KRAS*, assim como tumores com a mutação *KRAS* podem estar associados a metástases com *KRAS wildtype*<sup>184</sup>. Ainda assim não parece existir uma

diferença significativa em termos prognósticos, caso a mutação *KRAS* seja detetada através da biópsia tecidual ou líquida<sup>228</sup>. No caso de doentes com mutações *KRAS* no tumor primário, mas com ctDNA *KRAS wild type* poderá haver mesmo benefício no tratamento com cetuximab e panitumumab<sup>221</sup>. A deteção de ctDNA previamente ao tratamento com regorafenib também parece ser vantajosa<sup>231</sup>.

Os níveis de ctDNA também podem ser utilizados para monitorizar a resposta à terapêutica, verificando-se que, níveis mais elevados após a instituição de quimioterapia adjuvante, associam-se a doença mais resistente e com menor intervalo de sobrevivência livre de progressão<sup>232,233</sup>. A deteção *de novo* de mutações *KRAS* em biópsia líquida, durante a terapêutica anti-EGFR, também parece ser vantajosa, uma vez que pode preceder a deteção radiológica em vários meses<sup>221,234,235</sup>. Não obstante, alguns autores acautelam que existem ainda alguns problemas de sensibilidade e especificidade, associados à utilização do ctDNA em doentes com cancro colo-retal. A presença de níveis elevados de DNA circulante em patologias benignas, como é o caso de infeções, poderão comprometer a especificidade deste biomarcador, assim como a evolução genómica do próprio tumor que, através da aquisição de novas mutações, poderá comprometer a sua sensibilidade<sup>225</sup>.

O miR-106a, miR-130b, miR-326 e miR-484 encontram-se sobreexpressos em indivíduos submetidos a quimioterapia com 5-fluorouracilo e oxaliplatina e apresentaram uma menor sobrevivência geral e sobrevivência livre de progressão<sup>236</sup>. A expressão de miR-1914 e mir-1915 também difere significativamente entre doentes que demonstram uma boa ou má resposta ao tratamento, neste caso quando submetidos a quimioterapia com capecitabina e oxaliplatina<sup>237</sup>. A sobreexpressão de miR-19a ajudou a distinguir indivíduos que respondiam a quimioterapia FOLFOX, de indivíduos que não respondiam, sendo complementar ao doseamento de CEA - sugerindo assim um potencial papel da conjugação destes dois marcadores<sup>238</sup>. A sobreexpressão de miR-126 foi associada a uma pior resposta, em doentes submetidos a tratamento com bevacizumab<sup>14</sup>.

Concentrações mais baixas de miR-24, miR-320a e miR-423-5p associam-se a melhores respostas à terapêutica cirúrgica<sup>206</sup>.

## Ensaaios clínicos

Para além da obtenção de resultados preliminares positivos, é também necessária a sua validação em ensaios clínicos de maior dimensão, com vista à sua aplicação na prática clínica quotidiana. Segue-se então um levantamento de todos os ensaios clínicos em curso ou a recrutar doentes, registados até à data de 22 de abril de 2017 na base de dados *ClinicalTrials.gov* e na *EU Clinical Trials Register*. As palavras-chave utilizadas incluíram *liquid biopsy*, *circulating tumor cells*, *circulating tumor DNA*, *miRNA*, *esophageal cancer*, *gastric cancer*, *pancreatic cancer* e *colorectal cancer*.

[ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov)

### **Cancro esofágico**

Código do ensaio	Biomarcador estudado	Objetivo
NCT02464930	miRNA	Diagnóstico de esófago Barret e Adenocarcinoma
NCT02812680	CTCs + miRNA	Monitorização resposta quimioterapia
NCT03005314	CTCs	Monitorização resposta terapêutica cirúrgica
NCT03081988	ctDNA + miRNA	Prognóstico

### **Cancro gástrico**

Código do ensaio	Biomarcador estudado	Objetivo
NCT02955173	CTCs	Monitorização resposta terapêutica cirúrgica
NCT01848015	CTCs	Monitorização resposta terapêutica cirúrgica
NCT01625702	CTCs	Monitorização resposta quimioterapia
NCT02934984	ctDNA	Monitorização resposta terapêutica cirúrgica
NCT02674373	ctDNA	Capacidade preditiva resposta farmacológica
NCT02610218	CTCs + ctDNA	Monitorização resposta terapêutica dirigida (HER-2)

**Cancro pancreático**

Código do ensaio	Biomarcador estudado	Objetivo
NCT02072616	CTCs	Diagnóstico adenocarcinoma pancreático
NCT03032913	CTCs	Diagnóstico adenocarcinoma pancreático
NCT02451384	CTCs	Monitorização resposta terapêutica cirúrgica
NCT02335151	CTCs	Monitorização resposta terapêutica cirúrgica
NCT02707159	CTCs	Monitorização resposta quimioterapia
NCT03033927	CTCs	Monitorização resposta quimioterapia
NCT02974764	CTCs	Monitorização cirurgia, quimioterapia e radioterapia
NCT02555735	CTCs	Capacidade preditiva resposta farmacológica
NCT02531607	miRNA	Diagnóstico carcinoma pancreático
NCT02634502	miRNA	Marcador de prognóstico



**Cancro colo-retal**

Código do ensaio	Biomarcador estudado	Objetivo
NCT02874885	CTCs	Diagnóstico + Monitorização resposta quimioterapia
NCT03013868	CTCs	Monitorização resposta cirúrgica
NCT02955173	CTCs	Monitorização resposta cirúrgica
NCT02979470	CTCs	Monitorização resposta cirúrgica
NCT02554448	CTCs	Monitorização resposta quimioterapia
NCT02602938	CTCs	Efeitos da aspirina nas contagens CTCs
NCT02751177	ctDNA	Capacidade preditiva resposta farmacológica
NCT02792478	ctDNA	Capacidade preditiva resposta farmacológica
NCT02827565	ctDNA	Capacidade preditiva resposta farmacológica
NCT02502656	ctDNA	Capacidade preditiva resposta farmacológica
NCT02813928	ctDNA	Monitorização resposta cirúrgica
NCT02872779	ctDNA	Monitorização resposta quimioterapia
NCT02842203	ctDNA	Marcador de prognóstico
NCT02556281	CTCs + ctDNA	Comparação CTCs e ctDNA
NCT02635087	miRNA	Capacidade preditiva resposta quimioterapia

**Outros**

Código do ensaio	Biomarcador estudado	Objetivo
NCT02838836	CTCs + ctDNA	Comparação vários tumores sólidos – esófago, pancreático, gástrico e colo-retal

*EU Clinical Trials Register*

**Cancro colo-retal**

Código do ensaio	Biomarcador estudado	Objetivo
2014-004927-27	CtDNA	Monitorização resposta farmacológica
2012-000840-90	CTC	Capacidade preditiva resposta quimioterapia

## Conclusões

As biópsias líquidas constituirão provavelmente uma parte integrante da prática futura da Oncologia, uma vez que englobam biomarcadores com sensibilidades e especificidades superiores a outros marcadores atualmente utilizados, contornam algumas das dificuldades inerentes às biópsias tecidulares e podem inclusive gerar resultados com vários meses de antecedência, comparativamente com outros exames de diagnóstico. Alguns autores advertem para o facto de, na maioria dos casos, ser impossível proceder a uma abordagem adequada sem que se obtenha uma biópsia tecidular inicial, devido aos problemas associados com a sensibilidade e especificidade dos diferentes marcadores obtidos pelas biópsias líquidas<sup>17</sup>. No entanto, em alguns casos as biópsias líquidas poderão mesmo constituir uma alternativa mais vantajosa, sobretudo em doentes mais debilitados, dada a sua menor invasividade

Apesar dos vários resultados positivos obtidos até à data, é ainda fundamental que haja uma *standardização* de todo o processo pré-clínico, de recolha e processamento das amostras de biópsias líquidas, bem como da sua interpretação e definição de valores de *cut-off*, permitindo assim uniformizar toda a investigação, prosseguir com estudos de maior dimensão e obter dados que consolidem a sua importância na prática clínica, com impacto no diagnóstico precoce, gestão terapêutica e aumento da sobrevivência dos doentes.

Atualmente existem apenas duas aprovações para a utilização de biomarcadores de biópsias líquidas: o *cobas EGFR Mutation Test v2* em cancros pulmonares e o *CellSearch*® em cancro metastáticos do cólon, mama, próstata e da cabeça e do pescoço. Existem algumas fraquezas importantes associadas a estes métodos de diagnóstico, como é o caso da incapacidade de deteção de células tumorais EpCAM pelo *CellSearch*® - que acontece em até 25% dos casos -, tal como os resultados falsos-positivos em situações de doença inflamatória intestinal e diverticulose. Esse é um dos motivos pelo qual mais importante do que o papel isolado de cada biomarcador em cada um destes cancros, certamente será a sua complementariedade, quer sob a forma de painéis ou de investigações sequenciais. De facto, é exatamente esta a direção que vários ensaios clínicos parecem estar a tomar, nos quais se doseia uma combinação entre CTCs e ctDNA, ctDNA e miRNA, entre outros. No caso específico do ctDNA, este poderá ser mais útil para obter informação global acerca da “carga tumoral”, enquanto as CTCs poderão ter maior utilidade enquanto fatores de prognóstico – possivelmente como indicadores de suscetibilidade terapêutica, através da realização de testes funcionais<sup>9,18</sup>. Neste momento os ctNAs parecem ter um papel mais promissor ao nível do rastreio e diagnóstico precoce, estadiamento, capacidade preditiva e monitorização da resposta à terapêutica. Não obstante, no futuro provavelmente as biópsias líquidas integrarão vários destes elementos num único painel de marcadores.

As CTCs têm sobretudo um papel enquanto fator de prognóstico no cancro esofágico, estando os seus níveis aumentados associados a doença mais avançada, com invasão venosa e metastização ganglionar e, consequentemente, menor sobrevivência geral e menor intervalo de tempo livre de recidiva após tratamento cirúrgico. No adenocarcinoma esofágico os valores de CTCs parecem ser mais elevados através da pesquisa pelo *CellSearch*®, possivelmente por ter uma maior expressão de EpCAM. Talvez a pesquisa de CTCs com base em outras metodologias poderá ser mais vantajosa no caso do carcinoma pavimentoso. O doseamento de ctDNA permite distinguir entre indivíduos saudáveis e doentes e, nestes últimos, doença de estadiamento precoce e doença avançada. Adicionalmente permite também monitorizar a recidivas após tratamento, detetando-as até cerca de 6 meses mais precocemente do que as alterações imagiológicas. Sete miRNAs (miR-10a, miR-22, miR-100, miR-127-3p, miR-133a, miR-148b e miR-223)

demonstraram uma capacidade diagnóstica superior à do CEA. Vários outros miRNAs permitiram também estabelecer um estadiamento mais preciso e monitorizar a resposta à terapêutica cirúrgica e citostática.

A investigação das biópsias líquidas no cancro gástrico tem originado interesse em vários tipos de biomarcadores, desde as CTCs e ctDNA, até proteínas circulantes, auto-anticorpos, lncRNAs, piRNAs, DNA mitocondrial, metabolitos e microbiota comensal. As CTCs parecem ter uma baixa sensibilidade no rastreio de neoplasias gástricas, mas a sua elevada especificidade (99%) confere-lhe potencial enquanto teste de exclusão. Os seus níveis elevados estão também associados a um pior prognóstico, devido a doença mais avançada e, consequentemente, menor sobrevivência geral. O diagnóstico precoce destes cancros poderá sobretudo beneficiar da introdução do ctDNA, quer através do seu doseamento, quer pela identificação do padrão de metilação de alguns genes, como é o caso do BX141696, WT1, CYP26B1, KCNA4, SOX17, Runx3 e do p15. Estudos do tipo caso-controlo evidenciaram também um papel importante dos ctDNA, enquanto marcadores de monitorização de resposta à terapêutica cirúrgica, mas é ainda necessário que estes resultados sejam replicados em estudos com um desenho mais apropriado à obtenção de evidência científica de maior robustez. Novamente os miRNAs apresentam resultados positivos nos testes de comparação de plasma e/ou soro, tanto no diagnóstico, como no estadiamento e monitorização da resposta à terapêutica.

A sensibilidade do *CellSearch*<sup>®</sup> no diagnóstico de cancro pancreático não vai além dos 11% na doença localizada e avançadas e dos 19% na doença metastática, pelo que será necessário recorrer a outras metodologias no que diz respeito à aplicação das CTCs neste grupo de neoplasias. O doseamento de CTCs destaca-se apenas pelo seu valor prognóstico – níveis mais elevados encontram-se associados a intervalos livres de doença mais curtos e a menor sobrevivência geral -, podendo no futuro também servir de marcador de resposta à terapêutica com 5-fluorouracilo. Já o ctDNA é encontrado em 50% dos doentes em estadio precoce, pelo que vários autores afirmam que, adicionando ao doseamento desse marcador a identificação de mutações específicas, a sua sensibilidade poderá atingir valores com relevância para a sua aplicação na prática clínica. Note-se que a taxa de concordância entre a biópsia tecidular e a biópsia líquida, com base em ctDNA, é de 77-90%, demonstrando assim potencial para substituição de procedimentos mais invasivos por intervenções minimamente invasivas e suficientemente informativas. o ctDNA permite ainda um reconhecimento mais precoce de recidivas tumorais, ocorrendo esta 6,5 meses mais cedo do que as alterações à TAC. Os resultados positivos dos miRNAs destacam-se ao nível do diagnóstico, estadiamento e capacidade preditiva de resposta à terapêutica, sendo até possível isolar alguns destes em amostras de saliva. A conjugação de vários miRNAs em painéis parece constituir uma mais-valia, em termos de maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico.

O cancro colo-retal é a única neoplasia, de entre as abordadas nestes trabalho, para a qual atualmente existe uma aprovação da aplicação de biópsias líquidas - o *CellSearch*<sup>®</sup>, enquanto marcador independente de menor sobrevivência livre de doença e sobrevivência geral. O doseamento de CTCs permitem também identificar grupos de risco de maior recidiva nos diferentes estádios de doença, que por sua vez poderão então ser encaminhados para terapêuticas cirúrgicas e/ou citostáticas mais agressiva. A deteção de recidivas através das CTCs precede a ocorrência de alterações nos valores de CEA em até 6 meses. Através das CTCs é também possível o estado mutacional KRAS. O principal problema associado às CTCs é o seu papel enquanto método diagnóstico, uma vez a simples presença de doença inflamatória intestinal ou diverticulose pode ser suficiente para originar resultados falsos-positivos. A

deteção de ctDNA em doentes de risco mais elevado parece ter resultados satisfatórios, enquanto método diagnóstico. O doseamento de ctDNA tem ainda a vantagem de conseguir detetar recidivas tumorais cerca de 10 meses mais cedo, comparativamente com outros meios complementares de diagnóstico, para além de poder detetar mutações de pior prognóstico e estados mutacionais preditivos de resposta à terapêutica, como é o caso do KRAS. O aparecimento *de novo* de mutações KRAS é mais precocemente detetado com biópsias líquidas durante a terapêutica anti-EGFR, comparativamente com as biópsias tecidulares. Apesar de, numa pequena percentagem de casos, não existir concordância entre o estado mutacional KRAS entre o tumor primário e as suas metástases, parece haver benefício no tratamento com cetuximab e panitumumab, salientando assim a importância das biópsias líquidas enquanto método de determinação das mutações presentes em ambas as formas de crescimento neoplásico. Os miRNAs apresentam valores positivos numa ampla gama de aplicações, desde o rastreio, diagnóstico precoce, diagnóstico diferencial com doença inflamatória intestinal, estadiamento até à monitorização da resposta à terapêutica. Destaca-se a utilização de um painel de seis miRNAs, com valor preditivo de recorrência de doença em estádios precoces e a sua capacidade preditiva de resposta à quimioterapia.

Em ambas as bases de registo de ensaios clínicos *ClinicalTrials.Gov* e *EU Clinical Trials Register* contabilizaram-se 36 ensaios que pretendiam avaliar o papel das biópsias líquidas, verificando-se uma maior tendência para as suas aplicações enquanto marcador de monitorização de resposta à terapêutica, mas também enquanto marcador de diagnóstico e capacidade preditiva de resposta à terapêutica. No caso particular do cancro colo-retal, denota-se uma maior incidência neste último tipo de aplicação. Os biomarcadores mais utilizados nestes ensaios são as CTCs e os ctDNAs.

## Bibliografia

1. Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolff JA. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *N Engl J Med*. 1948;238(23):787-793. doi:10.1056/NEJM194806032382301.
2. Mukherjee S. *The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer*. Basic Books; 2011.
3. Larrea E, Sole C, Manterola L, et al. New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5). doi:10.3390/ijms17050627.
4. Francis G, Stein S. Circulating Cell-Free Tumour DNA in the Management of Cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16(6):14122-14142. doi:10.3390/ijms160614122.
5. Longo DL. Tumor Heterogeneity and Personalized Medicine. *N Engl J Med*. 2012;366(10):956-957. doi:10.1056/NEJMe1200656.
6. Pantel K, Alix-Panabières C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res*. 2013;73(21):6384-6388. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2030.
7. Prasad V, Fojo T, Brada M, et al. Precision oncology: origins, optimism, and potential. *Lancet Oncol*. 2016;17(2):e81-e86. doi:10.1016/S1470-2045(15)00620-8.
8. Millner LM, Strotman LN, Tobin NP, et al. The Future of Precision Medicine in Oncology. *Clin Lab Med*. 2016;36(3):557-573. doi:10.1016/j.cl.2016.05.003.
9. Ignatiadis M, Dawson S-J. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality? *Ann Oncol*. 2014;25(12):2304-2313. doi:10.1093/annonc/mdu480.
10. Wang H, Stoecklein NH, Lin PP, Gires O. Circulating and disseminated tumor cells: diagnostic tools and therapeutic targets in motion. *Oncotarget*. July 2015. doi:10.18632/oncotarget.12242.
11. Gires O, Stoecklein NH. Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(22):4393-4402. doi:10.1007/s00018-014-1693-1.
12. Meng S, Tripathy D, Shete S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(25):9393-9398. doi:10.1073/pnas.0402993101.
13. Strotman LN, Millner LM, Valdes R, Linder MW. Liquid Biopsies in Oncology and the Current Regulatory Landscape. *Mol Diagnosis Ther*. 2016:1-8. doi:10.1007/s40291-016-0220-5.
14. Izzotti A, Carozzo S, Pulliero A, Zhabayeva D, Ravetti JL, Bersimbaev R. Extracellular MicroRNA in liquid biopsy: applicability in cancer diagnosis and prevention. *Am J Cancer Res*. 2016;6(7):1461-1493. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27508091>. Accessed October 13, 2016.
15. Berry MF. Esophageal cancer: staging system and guidelines for staging and treatment. *J Thorac Dis*. 2014;6 Suppl 3(Suppl 3):S289-97. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.11.
16. Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, Schoenfeld PS, Burke CA, Inadomi JM. American College of Gastroenterology Guidelines for Colorectal Cancer Screening 2008. *Am J*

- Gastroenterol.* 2009;104(3):739-750. doi:10.1038/ajg.2009.104.
17. Hofman P, Popper HH. Pathologists and liquid biopsies: to be or not to be? *Virchows Arch.* 2016;1-9. doi:10.1007/s00428-016-2004-z.
  18. Caceres G, Puskas JA, Magliocco AM. Circulating Tumor Cells: A Window Into Tumor Development and Therapeutic Effectiveness. *Cancer Control.* 2015;22(2):167-176. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068761>. Accessed October 30, 2016.
  19. Rapado-González Ó, Majem B, Muinelo-Romay L, López-López R, Suarez-Cunqueiro MM. Cancer Salivary Biomarkers for Tumours Distant to the Oral Cavity. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9). doi:10.3390/ijms17091531.
  20. Pierga J-Y, Haxage D, Bachelot T, et al. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2012;23(3):618-624. doi:10.1093/annonc/mdr263.
  21. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aus Med J.* 1896;(14):146-147.
  22. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Ses Fil.* 1948;142(3-4):241-243. doi:10.1007/BF00832140.
  23. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov.* 2016;6(5):479-491. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1483.
  24. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010;56(11):1733-1741. doi:10.1373/clinchem.2010.147405.
  25. Voelker R. Liquid Biopsy Receives Approval. *JAMA.* 2016;316(3):260. doi:10.1001/jama.2016.8833.
  26. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 1989;8(2):98-101. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2673568>. Accessed October 29, 2016.
  27. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):453-458. doi:10.1038/nrc1098.
  28. Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene.* 2016;35(10):1216-1224. doi:10.1038/onc.2015.192.
  29. Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the "leukemic phase" of solid cancers. *Trends Mol Med.* 2006;12(3):130-139. doi:10.1016/j.molmed.2006.01.006.
  30. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al. Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8152-8162. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1110.
  31. O'Flaherty JD, Gray S, Richard D, et al. Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer. *Lung Cancer.* 2012;76(1):19-25. doi:10.1016/j.lungcan.2011.10.018.
  32. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, et al. Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. *Am J Pathol.* 1998;153(3):865-873. doi:10.1016/S0002-9440(10)65628-3.

33. Fidler IJ. Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With 125I-5-Iodo-2'-deoxyuridine. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1970;45(4):773-782. doi:10.1093/JNCI/45.4.773.
34. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell.* 2014;158(5):1110-1122. doi:10.1016/j.cell.2014.07.013.
35. Salvianti F, Pazzagli M, Pinzani P. Single circulating tumor cell sequencing as an advanced tool in cancer management. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(1):51-63. doi:10.1586/14737159.2016.1116942.
36. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell.* 2009;139(5):871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007.
37. Plaks V, Koopman CD, Werb Z. Circulating Tumor Cells. *Science (80- ).* 2013;341(6151):1186-1188. doi:10.1126/science.1235226.
38. Pantel K, Denève E, Nocca D, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem.* 2012;58(5):936-940. doi:10.1373/clinchem.2011.175570.
39. Kimura H, Kato H, Faried A, et al. Prognostic significance of EpCAM expression in human esophageal cancer. *Int J Oncol.* 2007;30(1):171-179. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143526>. Accessed November 1, 2016.
40. Went P, Vasei M, Bubendorf L, et al. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer.* 2006;94(1):128-135. doi:10.1038/sj.bjc.6602924.
41. Fong D, Steurer M, Obrist P, et al. Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance. *J Clin Pathol.* 2008;61(1):31-35. doi:10.1136/jcp.2006.037333.
42. Gingras I, Salgado R, Ignatiadis M. Liquid biopsy: will it be the “magic tool” for monitoring response of solid tumors to anticancer therapies? *Curr Opin Oncol.* 2015;27(6):560-567. doi:10.1097/CCO.0000000000000223.
43. Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol.* 2014;32(31):3483-3489. doi:10.1200/JCO.2014.56.2561.
44. Aarthy R, Mani S, Velusami S, Sundarsingh S, Rajkumar T. Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. *Mol Diagn Ther.* 2015;19(6):339-350. doi:10.1007/s40291-015-0167-y.
45. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget.* May 2016. doi:10.18632/oncotarget.9453.
46. Ghorbian S, Ardekani AM. Non-Invasive Detection of Esophageal Cancer using Genetic Changes in Circulating Cell-Free DNA. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2012;4(1):3-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23407878>. Accessed December 31, 2016.
47. Pantel K, Alix-Panabieres C. Real-time Liquid Biopsy in Cancer Patients: Fact or Fiction? *Cancer Res.* 2013;73(21):6384-6388. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2030.
48. Schwarzenbach H, Stoecklacher J, Pantel K, Goekkurt E. Detection and Monitoring of Cell-Free DNA in Blood of Patients with Colorectal Cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1137(1):190-196. doi:10.1196/annals.1448.025.



49. Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J cancer*. 2013;133(2):346-356. doi:10.1002/ijc.28030.
50. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, et al. Prediction of Breast Tumor Progression by Integrity of Free Circulating DNA in Serum. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4270-4276. doi:10.1200/JCO.2006.05.9493.
51. Harada K, Baba Y, Ishimoto T, et al. The role of microRNA in esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol*. 2016;51(6):520-530. doi:10.1007/s00535-016-1161-9.
52. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522-531. doi:10.1038/nrg1379.
53. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(30):10513-10518. doi:10.1073/pnas.0804549105.
54. Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res*. 1999;5(8):1961-1965. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473072>. Accessed January 28, 2017.
55. Imamura T, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol*. 2016;22(25):5627-5641. doi:10.3748/wjg.v22.i25.5627.
56. Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Circulating MicroRNAs: A Next-Generation Clinical Biomarker for Digestive System Cancers. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9):1459. doi:10.3390/ijms17091459.
57. Rana S, Malinowska K, Zöller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia*. 2013;15(3):281-295. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479506>. Accessed October 17, 2016.
58. Mao L, Li J, Chen W, et al. Exosomes decrease sensitivity of breast cancer cells to adriamycin by delivering microRNAs. *Tumor Biol*. 2016;37(4):5247-5256. doi:10.1007/s13277-015-4402-2.
59. de Souza PS, Faccion RS, Bernardo PS, Maia RC. Membrane microparticles: shedding new light into cancer cell communication. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(7):1395-1406. doi:10.1007/s00432-015-2029-8.
60. Maushagen R, Pries R, Wollenberg B. Chemotherapie mit Paclitaxel führt zu microRNA-Freisetzung. *HNO*. 2015;63(11):792-796. doi:10.1007/s00106-015-0080-z.
61. Hannafon BN, Carpenter KJ, Berry WL, Janknecht R, Dooley WC, Ding W-Q. Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). *Mol Cancer*. 2015;14(1):133. doi:10.1186/s12943-015-0400-7.
62. Gai C, Carpanetto A, Deregibus MC, Camussi G. Extracellular vesicle-mediated modulation of angiogenesis. *Histol Histopathol*. 2016;31(4):379-391. doi:10.14670/HH-11-708.
63. Tiberio P, Callari M, Angeloni V, Daidone MG, Appierto V. Challenges in Using Circulating miRNAs as Cancer Biomarkers. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1-10. doi:10.1155/2015/731479.

64. GORMALLY E, CABOUX E, VINEIS P, HAINAUT P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. *Mutat Res Mutat Res*. 2007;635(2-3):105-117. doi:10.1016/j.mrrev.2006.11.002.
65. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev*. 1999;18(1):65-73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10505546>. Accessed November 6, 2016.
66. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—A survey. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2007;1775(1):181-232. doi:10.1016/j.bbcan.2006.10.001.
67. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977;37(3):646-650. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/837366>. Accessed November 26, 2016.
68. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14(9):985-990. doi:10.1038/nm.1789.
69. Lebofsky R, Decraene C, Bernard V, et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Mol Oncol*. 2015;9(4):783-790. doi:10.1016/j.molonc.2014.12.003.
70. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(13):1199-1209. doi:10.1056/NEJMoa1213261.
71. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra24-224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094.
72. Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(21):3902-3908. doi:10.1200/JCO.2003.02.006.
73. Schwarz AK, Stanulla M, Cario G, et al. Quantification of free total plasma DNA and minimal residual disease detection in the plasma of children with acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol*. 2009;88(9):897-905. doi:10.1007/s00277-009-0698-6.
74. Diaz LA, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):579-586. doi:10.1200/JCO.2012.45.2011.
75. Bozic I, Reiter JG, Allen B, et al. Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. *Elife*. 2013;2:e00747. doi:10.7554/eLife.00747.
76. Yeh C-H. Circulating Cell-Free DNA: The Blood Biopsy in Cancer Management. *MOJ Cell Sci Rep*. 2015;2(2):21. doi:10.15406/mojcsr.2015.02.00021.
77. Hohaus S, Giachelia M, Massini G, et al. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol*. 2009;20(8):1408-1413. doi:10.1093/annonc/mdp006.
78. Mussolin L, Burnelli R, Pillon M, et al. Plasma cell-free DNA in paediatric lymphomas. *J Cancer*. 2013;4(4):323-329. doi:10.7150/jca.6226.
79. Roth C, Pantel K, Müller V, et al. Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with

- breast cancer progression. *BMC Cancer*. 2011;11(1):4. doi:10.1186/1471-2407-11-4.
80. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med*. 2015;7(302):302ra133-302ra133. doi:10.1126/scitranslmed.aab0021.
81. Jones H. On a New Substance Occuring in the Urine of a Patient With Mollities Ossium. *CA Cancer J Clin*. 1978;28(1):49-56. doi:10.3322/canjclin.28.1.49.
82. Gallerani G, Fabbri F. Circulating Tumor Cells in the Adenocarcinoma of the Esophagus. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8). doi:10.3390/ijms17081266.
83. Compton CC, Byrd DR, Garcia-Aguilar J, Kurtzman SH, Olawaiye A, Washington MK, eds. *AJCC Cancer Staging Atlas*. New York, NY: Springer New York; 2012. doi:10.1007/978-1-4614-2080-4.
84. Li S-P, Guan Q-L, Zhao D, et al. Detection of Circulating Tumor Cells by Fluorescent Immunohistochemistry in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Potential Clinical Applications. *Med Sci Monit*. 2016;22:1654-1662. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184872>. Accessed December 26, 2016.
85. Reeh M, Effenberger KE, Koenig AM, et al. Circulating Tumor Cells as a Biomarker for Preoperative Prognostic Staging in Patients With Esophageal Cancer. *Ann Surg*. 2015;261(6):1124-1130. doi:10.1097/SLA.0000000000001130.
86. Qiao G-L, Qi W-X, Jiang W-H, Chen Y, Ma L-J. Prognostic significance of circulating tumor cells in esophageal carcinoma: a meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2016;9:1889-1897. doi:10.2147/OTT.S100005.
87. Lan Y-T, Chen M-H, Fang W-L, et al. Clinical relevance of cell-free DNA in gastrointestinal tract malignancy. *Oncotarget*. 2016;5(0). doi:10.18632/oncotarget.13821.
88. Hsieh C-C, Hsu H-S, Chang S-C, Chen Y-J. Circulating Cell-Free DNA Levels Could Predict Oncological Outcomes of Patients Undergoing Esophagectomy for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2131. doi:10.3390/ijms17122131.
89. Ueda M, Iguchi T, Masuda T, et al. Somatic mutations in plasma cell-free DNA are diagnostic markers for esophageal squamous cell carcinoma recurrence. *Oncotarget*. 2016;7(38):62280-62291. doi:10.18632/oncotarget.11409.
90. van der Vaart M, Pretorius PJ. Is the role of circulating DNA as a biomarker of cancer being prematurely overrated? *Clin Biochem*. 2010;43(1-2):26-36. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.08.027.
91. Kawakami K, Brabender J, Lord R V, et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(22):1805-1811. doi:10.1093/JNCI/92.22.1805.
92. Hibi K, Taguchi M, Nakayama H, et al. Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2001;7(10):3135-3138. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595706>. Accessed December 31, 2016.
93. Liu J-B, Qiang F-L, Dong J, et al. Plasma DNA methylation of Wnt antagonists predicts recurrence of esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2011;17(44):4917-4921. doi:10.3748/wjg.v17.i44.4917.

94. Eisenberger CF, Knoefel WT, Peiper M, et al. Squamous cell carcinoma of the esophagus can be detected by microsatellite analysis in tumor and serum. *Clin Cancer Res*. 2003;9(11):4178-4183. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14519643>. Accessed December 31, 2016.
95. Zhang C, Wang C, Chen X, et al. Expression Profile of MicroRNAs in Serum: A Fingerprint for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Chem*. 2010;56(12):1871-1879. doi:10.1373/clinchem.2010.147553.
96. Liu R, Liao J, Yang M, et al. Circulating miR-155 Expression in Plasma: A Potential Biomarker for Early Diagnosis of Esophageal Cancer in Humans. *J Toxicol Environ Heal Part A*. 2012;75(18):1154-1162. doi:10.1080/15287394.2012.699856.
97. Hirajima S, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Clinical impact of circulating miR-18a in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2013;108(9):1822-1829. doi:10.1038/bjc.2013.148.
98. Komatsu S, Ichikawa D, Hirajima S, et al. Plasma microRNA profiles: identification of miR-25 as a novel diagnostic and monitoring biomarker in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2014;111(8):1614-1624. doi:10.1038/bjc.2014.451.
99. Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2011;105(1):104-111. doi:10.1038/bjc.2011.198.
100. Takeshita N, Hoshino I, Mori M, et al. Serum microRNA expression profile: miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2013;108(3):644-652. doi:10.1038/bjc.2013.8.
101. Sun L, Dong S, Dong C, et al. Predictive value of plasma miRNA-718 for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Biomarkers*. 2016;16(2):265-273. doi:10.3233/CBM-150564.
102. Chiam K, Wang T, Watson DI, et al. Circulating Serum Exosomal miRNAs As Potential Biomarkers for Esophageal Adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2015;19(7):1208-1215. doi:10.1007/s11605-015-2829-9.
103. Banki F, Yacoub WN, Hagen JA, et al. Plasma DNA Is More Reliable than Carcinoembryonic Antigen for Diagnosis of Recurrent Esophageal Cancer. *J Am Coll Surg*. 2008;207(1):30-35. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2008.01.004.
104. Tomochika S, Iizuka N, Watanabe Y, et al. Increased serum cell-free DNA levels in relation to inflammation are predictive of distant metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med*. 2010;1(1):89-92. doi:10.3892/etm\_00000016.
105. Tomita H, Ichikawa D, Ikoma D, et al. Quantification of circulating plasma DNA fragments as tumor markers in patients with esophageal cancer. *Anticancer Res*. 27(4C):2737-2741. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17695440>. Accessed December 28, 2016.
106. Banki F, Mason RJ, Oh D, et al. Plasma DNA as a Molecular Marker for Completeness of Resection and Recurrent Disease in Patients With Esophageal Cancer. *Arch Surg*. 2007;142(6):533. doi:10.1001/archsurg.142.6.533.
107. Komatsu S, Ichikawa D, Hirajima S, et al. Clinical Impact of Predicting CCND1 Amplification Using Plasma DNA in Superficial Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2014;59(6):1152-1159. doi:10.1007/s10620-013-3005-2.

108. Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, et al. Prognostic impact of circulating *miR-21* and *miR-375* in plasma of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(sup1):S53-S59. doi:10.1517/14712598.2012.681373.
109. Tanaka K, Miyata H, Sugimura K, et al. *miR-27* is associated with chemoresistance in esophageal cancer through transformation of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts. *Carcinogenesis.* 2015;36(8):894-903. doi:10.1093/carcin/bgv067.
110. Tanaka K, Miyata H, Yamasaki M, et al. Circulating *miR-200c* Levels Significantly Predict Response to Chemotherapy and Prognosis of Patients Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy for Esophageal Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(S3):607-615. doi:10.1245/s10434-013-3093-4.
111. Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, et al. Circulating *miR-21* as an independent predictive biomarker for chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2016;6(7):1511-1523. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27508093>. Accessed April 21, 2017.
112. Odenthal M, Hee J, Gockel I, et al. Serum microRNA profiles as prognostic/predictive markers in the multimodality therapy of locally advanced adenocarcinomas of the gastroesophageal junction. *Int J Cancer.* 2015;137(1):230-237. doi:10.1002/ijc.29363.
113. Li B-X, Yu Q, Shi Z-L, Li P, Fu S. Circulating microRNAs in esophageal squamous cell carcinoma: association with locoregional staging and survival. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(5):7241-7250. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26221263>. Accessed April 21, 2017.
114. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-E386. doi:10.1002/ijc.29210.
115. Lu J, Huang C, Zheng C, et al. Consideration of tumor size improves the accuracy of TNM predictions in patients with gastric cancer after curative gastrectomy. *Surg Oncol.* 2013;22(3):167-171. doi:10.1016/j.suronc.2013.05.002.
116. Wan Q-S, Zhang K-H. Noninvasive detection of gastric cancer. *Tumor Biol.* 2016;37(9):11633-11643. doi:10.1007/s13277-016-5129-4.
117. Tang L, Zhao S, Liu W, et al. Diagnostic accuracy of circulating tumor cells detection in gastric cancer: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2013;13(1):314. doi:10.1186/1471-2407-13-314.
118. Kim YS, Kim HJ, Choi BY, et al. Quantitative analysis of cell-free DNA in the plasma of gastric cancer patients. *Oncol Lett.* 2012;3(4):921-926. doi:10.3892/ol.2012.592.
119. Kim K, Shin DG, Park MK, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res.* 2014;86(3):136. doi:10.4174/astr.2014.86.3.136.
120. Zheng Y, Chen L, Li J, et al. Hypermethylated DNA as potential biomarkers for gastric cancer diagnosis. *Clin Biochem.* 2011;44(17-18):1405-1411. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.09.006.
121. Balgkouranidou I, Karayiannakis A, Matthaios D, et al. Assessment of SOX17 DNA methylation in cell free DNA from patients with operable gastric cancer. Association with prognostic variables and survival. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(7):1505-1510. doi:10.1515/cclm-2012-0320.

122. Sakakura C, Hamada T, Miyagawa K, et al. Quantitative analysis of tumor-derived methylated RUNX3 sequences in the serum of gastric cancer patients. *Anticancer Res.* 2009;29(7):2619-2625. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19596937>. Accessed January 22, 2017.
123. Leung WK, To K-F, Chu ESH, et al. Potential diagnostic and prognostic values of detecting promoter hypermethylation in the serum of patients with gastric cancer. *Br J Cancer.* 2005;92(12):2190-2194. doi:10.1038/sj.bjc.6602636.
124. Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer.* 2010;102(7):1174-1179. doi:10.1038/sj.bjc.6605608.
125. Tsujiura M, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Circulating miR-18a in plasma contributes to cancer detection and monitoring in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2015;18(2):271-279. doi:10.1007/s10120-014-0363-1.
126. Liu H, Zhu L, Liu B, et al. Genome-wide microRNA profiles identify miR-378 as a serum biomarker for early detection of gastric cancer. *Cancer Lett.* 2012;316(2):196-203. doi:10.1016/j.canlet.2011.10.034.
127. Konishi H, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Detection of gastric cancer-associated microRNAs on microRNA microarray comparing pre- and post-operative plasma. *Br J Cancer.* 2012;106(4):740-747. doi:10.1038/bjc.2011.588.
128. Zhang X, Yan Z, Zhang J, et al. Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. *Ann Oncol.* 2011;22(10):2257-2266. doi:10.1093/annonc/mdq758.
129. Imaoka H, Toiyama Y, Okigami M, et al. Circulating microRNA-203 predicts metastases, early recurrence, and poor prognosis in human gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2016;19(3):744-753. doi:10.1007/s10120-015-0521-0.
130. Komatsu S, Ichikawa D, Tsujiura M, et al. Prognostic impact of circulating miR-21 in the plasma of patients with gastric carcinoma. *Anticancer Res.* 2013;33(1):271-276. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23267156>. Accessed April 22, 2017.
131. Fu Z, Qian F, Yang X, Jiang H, Chen Y, Liu S. Circulating miR-222 in plasma and its potential diagnostic and prognostic value in gastric cancer. *Med Oncol.* 2014;31(9):164. doi:10.1007/s12032-014-0164-8.
132. Valladares-Ayerbes M, Reboredo M, Medina-Villaamil V, et al. Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *J Transl Med.* 2012;10:186. doi:10.1186/1479-5876-10-186.
133. Su Z-X, Zhao J, Rong Z-H, Wu Y-G, Geng W-M, Qin C-K. Diagnostic and prognostic value of circulating miR-18a in the plasma of patients with gastric cancer. *Tumor Biol.* 2014;35(12):12119-12125. doi:10.1007/s13277-014-2516-6.
134. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262.
135. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic Adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2014;371(11):1039-1049. doi:10.1056/NEJMra1404198.
136. Gao Y, Zhu Y, Yuan Z. Circulating Tumor Cells and CirGao, Y., Zhu, Y., & Yuan, Z. (2016). Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA Provide New Insights into Pancreatic Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 13(12), 902–913.

- <http://doi.org/10.7150/ijms.1673>. *Int J Med Sci*. 2016;13(12):902-913. doi:10.7150/ijms.16734.
137. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26(suppl 5):v56-v68. doi:10.1093/annonc/mdv295.
  138. Lewis AR, Valle JW, McNamara MG. Pancreatic cancer: Are “liquid biopsies” ready for prime-time? *World J Gastroenterol*. 2016;22(32):7175-7185. doi:10.3748/wjg.v22.i32.7175.
  139. Yachida S, Jones S, Bozic I, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*. 2010;467(7319):1114-1117. doi:10.1038/nature09515.
  140. Rhim AD, Thege FI, Santana SM, et al. Detection of circulating pancreas epithelial cells in patients with pancreatic cystic lesions. *Gastroenterology*. 2014;146(3):647-651. doi:10.1053/j.gastro.2013.12.007.
  141. Bidard FC, Huguet F, Louvet C, et al. Circulating tumor cells in locally advanced pancreatic adenocarcinoma: the ancillary CirCe 07 study to the LAP 07 trial. *Ann Oncol*. 2013;24(8):2057-2061. doi:10.1093/annonc/mdt176.
  142. Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6897-6904. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0378.
  143. Komar G, Kauhanen S, Liukko K, et al. Decreased Blood Flow with Increased Metabolic Activity: A Novel Sign of Pancreatic Tumor Aggressiveness. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5511-5517. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0414.
  144. Jiao LR, Apostolopoulos C, Jacob J, et al. Unique Localization of Circulating Tumor Cells in Patients With Hepatic Metastases. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6160-6165. doi:10.1200/JCO.2009.24.5837.
  145. Bissolati M, Sandri MT, Burtulo G, Zorzino L, Balzano G, Braga M. Portal vein-circulating tumor cells predict liver metastases in patients with resectable pancreatic cancer. *Tumor Biol*. 2015;36(2):991-996. doi:10.1007/s13277-014-2716-0.
  146. Zhang Y, Wang F, Ning N, et al. Patterns of circulating tumor cells identified by CEP8, CK and CD45 in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2015;136(5):1228-1233. doi:10.1002/ijc.29070.
  147. Nagrath S, Sequist L V., Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007;450(7173):1235-1239. doi:10.1038/nature06385.
  148. Ren C, Han C, Zhang J, et al. Detection of apoptotic circulating tumor cells in advanced pancreatic cancer following 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Biol Ther*. 2011;12(8):700-706. doi:10.4161/cbt.12.8.15960.
  149. Ma X-L, Li Y-Y, Zhang J, et al. Prognostic role of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(15):6015-6020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25124566>. Accessed February 10, 2017.
  150. Han L, Chen W, Zhao Q. Prognostic value of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a meta-analysis. *Tumor Biol*. 2014;35(3):2473-2480.

doi:10.1007/s13277-013-1327-5.

151. Sausen M, Phallen J, Adleff V, et al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat Commun.* 2015;6:7686. doi:10.1038/ncomms8686.
152. Vasen H, Ibrahim I, Ponce CG, et al. Benefit of Surveillance for Pancreatic Cancer in High-Risk Individuals: Outcome of Long-Term Prospective Follow-Up Studies From Three European Expert Centers. *J Clin Oncol.* 2016;34(17):2010-2019. doi:10.1200/JCO.2015.64.0730.
153. Tada M, Omata M, Ohto M. Clinical application of ras gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology.* 1991;100(1):233-238. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1983826>. Accessed January 28, 2017.
154. Wu J, Zhou Y, Zhang C, et al. Co-amplification at Lower Denaturation-temperature PCR Combined with Unlabeled-probe High-resolution Melting to Detect KRAS Codon 12 and 13 Mutations in Plasma-circulating DNA of Pancreatic Adenocarcinoma Cases. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2014;15(24):10647-10652.
155. Liggett T, Melnikov A, Yi Q, et al. Differential methylation of cell-free circulating DNA among patients with pancreatic cancer versus chronic pancreatitis. *Cancer.* 2010;116(7):1674-1680. doi:10.1002/cncr.24893.
156. Kinugasa H, Nouse K, Miyahara K, et al. Detection of *K-ras* gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer. *Cancer.* 2015;121(13):2271-2280. doi:10.1002/cncr.29364.
157. Zill OA, Greene C, Sebisanoovic D, et al. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. *Cancer Discov.* 2015;5(10):1040-1048. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0274.
158. Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Circulating RNAs as new biomarkers for detecting pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2015;21(28):8527. doi:10.3748/wjg.v21.i28.8527.
159. Li A, Yu J, Kim H, et al. MicroRNA Array Analysis Finds Elevated Serum miR-1290 Accurately Distinguishes Patients with Low-Stage Pancreatic Cancer from Healthy and Disease Controls. *Clin Cancer Res.* 2013;19(13):3600-3610. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3092.
160. Wang W-S, Liu L-X, Li G-P, et al. Combined Serum CA19-9 and miR-27a-3p in Peripheral Blood Mononuclear Cells to Diagnose Pancreatic Cancer. *Cancer Prev Res.* 2013;6(4):331-338. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-12-0307.
161. Wang J, Raimondo M, Guha S, et al. Circulating microRNAs in Pancreatic Juice as Candidate Biomarkers of Pancreatic Cancer. *J Cancer.* 2014;5(8):696-705. doi:10.7150/jca.10094.
162. Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Clinical impact of circulating miR-221 in plasma of patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2013;108(2):361-369. doi:10.1038/bjc.2012.546.
163. Schultz NA, Dehlendorff C, Jensen B V., et al. MicroRNA Biomarkers in Whole Blood for Detection of Pancreatic Cancer. *JAMA.* 2014;311(4):392. doi:10.1001/jama.2013.284664.



164. Miyamae M, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Plasma microRNA profiles: identification of miR-744 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2015;113(10):1467-1476. doi:10.1038/bjc.2015.366.
165. Earl J, Garcia-Nieto S, Martinez-Avila JC, et al. Circulating tumor cells (CTC) and KRAS mutant circulating free DNA (cfDNA) detection in peripheral blood as biomarkers in patients diagnosed with exocrine pancreatic cancer. *BMC Cancer*. 2015;15(1):797. doi:10.1186/s12885-015-1779-7.
166. Singh N, Gupta S, Pandey RM, Chauhan SS, Saraya A. High Levels of Cell-Free Circulating Nucleic Acids in Pancreatic Cancer are Associated With Vascular Encasement, Metastasis and Poor Survival. *Cancer Invest*. 2015;33(3):78-85. doi:10.3109/07357907.2014.1001894.
167. Benson VS, Patnick J, Davies AK, Nadel MR, Smith RA, Atkin WS. Colorectal cancer screening: A comparison of 35 initiatives in 17 countries. *Int J Cancer*. 2007;122(6):1357-1367. doi:10.1002/ijc.23273.
168. Carpelan-Holmström M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Haglund C. CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res*. 22(4):2311-2316. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12174919>. Accessed February 12, 2017.
169. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Validation Study of the CellSearch System. *Clin Cancer Res*. 2007;13(3).
170. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(19).
171. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3213-3221. doi:10.1200/JCO.2007.15.8923.
172. Groot Koerkamp B, Rahbari NN, Büchler MW, Koch M, Weitz J. Circulating Tumor Cells and Prognosis of Patients with Resectable Colorectal Liver Metastases or Widespread Metastatic Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(7):2156-2165. doi:10.1245/s10434-013-2907-8.
173. Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1714-1726. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.008.
174. Hardingham J, Grover P, Winter M, Hewett PJ, Price TJ, Thierry B. Detection and Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer - 20 years of progress. *Mol Med*. 2015;21(Suppl 1):1. doi:10.2119/molmed.2015.00149.
175. Uen Y-H, Lin S-R, Wu D-C, et al. Prognostic Significance of Multiple Molecular Markers for Patients With Stage II Colorectal Cancer Undergoing Curative Resection. *Ann Surg*. 2007;246(6):1040-1046. doi:10.1097/SLA.0b013e318142d918.
176. Uen Y-H, Lu C-Y, Tsai H-L, et al. Persistent Presence of Postoperative Circulating Tumor Cells is a Poor Prognostic Factor for Patients with Stage I–III Colorectal Cancer after Curative Resection. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(8):2120-2128. doi:10.1245/s10434-008-9961-7.

177. Lu C-Y, Uen Y-H, Tsai H-L, et al. Molecular detection of persistent postoperative circulating tumour cells in stages II and III colon cancer patients via multiple blood sampling: prognostic significance of detection for early relapse. *Br J Cancer*. 2011;104(7):1178-1184. doi:10.1038/bjc.2011.40.
178. Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, et al. Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. *Int J cancer*. 2000;89(1):8-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719724>. Accessed February 15, 2017.
179. Hardingham JE, Kotasek D, Sage RE, Eaton MC, Pascoe VH, Dobrovic A. Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer by immunobead-PCR is a sensitive prognostic marker for relapse of disease. *Mol Med*. 1995;1(7):789-794. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8612201>. Accessed February 15, 2017.
180. Wang J-Y, Lin S-R, Wu D-C, et al. Multiple Molecular Markers as Predictors of Colorectal Cancer in Patients with Normal Perioperative Serum Carcinoembryonic Antigen Levels. *Clin Cancer Res*. 2007;13(8):2406-2413. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2054.
181. Lu C-Y, Tsai H-L, Uen Y-H, et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining clinical outcome to mFOLFOX chemotherapy in patients with stage III colon cancer. *Br J Cancer*. 2013;108(4):791-797. doi:10.1038/bjc.2012.595.
182. Krebs MG, Renahan AG, Backen A, et al. Circulating Tumor Cell Enumeration in a Phase II Trial of a Four-Drug Regimen in Advanced Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2015;14(2):115-22-2. doi:10.1016/j.clcc.2014.12.006.
183. Yen L-C, Yeh Y-S, Chen C-W, et al. Detection of KRAS Oncogene in Peripheral Blood as a Predictor of the Response to Cetuximab Plus Chemotherapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(13).
184. Mao C, Wu X-Y, Yang Z-Y, et al. Concordant analysis of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, and PTEN expression between primary colorectal cancer and matched metastases. *Sci Rep*. 2015;5:8065. doi:10.1038/srep08065.
185. Gazzaniga P, Raimondi C, Nicolazzo C, et al. The rationale for liquid biopsy in colorectal cancer: a focus on circulating tumor cells. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(7):925-932. doi:10.1586/14737159.2015.1045491.
186. El-Gayar D, El-Abd N, Hassan N, Ali R. Increased Free Circulating DNA Integrity Index as a Serum Biomarker in Patients with Colorectal Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(3):939-944. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27039817>. Accessed February 20, 2017.
187. Hao TB, Shi W, Shen XJ, et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014;111(8):1482-1489. doi:10.1038/bjc.2014.470.
188. Hansen TF, Andersen RF, Pallisgaard N, et al. A 3-weekly schedule of irinotecan and panitumumab for wild-type KRAS metastatic colorectal cancer. *Color Cancer*. 2014;3(2):135-145. doi:10.2217/crc.13.85.
189. da Silva Filho BF, Gurgel APAD, Neto MÁ de FL, et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker of colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2013;66(9):775-778. doi:10.1136/jclinpath-2013-201521.
190. Perkins G, Yap TA, Pope L, et al. Multi-Purpose Utility of Circulating Plasma DNA Testing

- in Patients with Advanced Cancers. Perez-Gracia JL, ed. *PLoS One*. 2012;7(11):e47020. doi:10.1371/journal.pone.0047020.
191. Qi J, Qian C, Shi W, et al. Alu-based cell-free DNA: A potential complementary biomarker for diagnosis of colorectal cancer. *Clin Biochem*. 2013;46(1-2):64-69. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.08.026.
  192. Mead R, Duku M, Bhandari P, Cree IA. Circulating tumour markers can define patients with normal colons, benign polyps, and cancers. *Br J Cancer*. 2011;105(2):239-245. doi:10.1038/bjc.2011.230.
  193. Czeiger D, Shaked G, Eini H, et al. Measurement of Circulating Cell-Free DNA Levels by a New Simple Fluorescent Test in Patients With Primary Colorectal Cancer. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(2):264-270. doi:10.1309/AJCP4RK2IHVKTTZV.
  194. Danese E, Montagnana M, Minicozzi AM, et al. Real-time polymerase chain reaction quantification of free DNA in serum of patients with polyps and colorectal cancers. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(11):1665-1668. doi:10.1515/CCLM.2010.301.
  195. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2008;263(2):170-181. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.021.
  196. Boni L, Cassinotti E, Canziani M, Dionigi G, Rovera F, Dionigi R. Free circulating DNA as possible tumour marker in colorectal cancer. *Surg Oncol*. 2007;16:29-31. doi:10.1016/j.suronc.2007.10.004.
  197. Flamini E, Mercatali L, Nanni O, et al. Free DNA and Carcinoembryonic Antigen Serum Levels: An Important Combination for Diagnosis of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(23):6985-6988. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1931.
  198. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer*. 1983;51(11):2116-2120. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6188527>. Accessed February 20, 2017.
  199. Perrone F, Lampis A, Bertan C, et al. Circulating free DNA in a screening program for early colorectal cancer detection. *Tumori*. 100(2):115-121. doi:10.1700/1491.16389.
  200. Wang R, Wen H, Xu Y, et al. Circulating MicroRNAs as a Novel Class of Diagnostic Biomarkers in Gastrointestinal Tumors Detection: A Meta-Analysis Based on 42 Articles. Gorlova OY, ed. *PLoS One*. 2014;9(11):e113401. doi:10.1371/journal.pone.0113401.
  201. Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, et al. Serum miR-21 as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2013;105(12):849-859. doi:10.1093/jnci/djt101.
  202. Yin J, Bai Z, Song J, et al. Differential expression of serum miR-126, miR-141 and miR-21 as novel biomarkers for early detection of liver metastasis in colorectal cancer. *Chin J Cancer Res*. 2014;26(1):95-103. doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2014.02.07.
  203. Yamada A, Horimatsu T, Okugawa Y, et al. Serum miR-21, miR-29a, and miR-125b Are Promising Biomarkers for the Early Detection of Colorectal Neoplasia. *Clin Cancer Res*. 2015;21(18):4234-4242. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2793.
  204. Ng EKO, Chong WWS, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009;58(10):1375-1381. doi:10.1136/gut.2008.167817.

205. Li H-G, Zhao L-H, Bao X-B, Sun P-C, Zhai B-P. Meta-analysis of the differentially expressed colorectal cancer-related microRNA expression profiles. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(14):2048-2057. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027346>. Accessed March 5, 2017.
206. Fang Z, Tang J, Bai Y, et al. Plasma levels of microRNA-24, microRNA-320a, and microRNA-423-5p are potential biomarkers for colorectal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34(1):86. doi:10.1186/s13046-015-0198-6.
207. Link A, Balaguer F, Shen Y, et al. Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(7):1766-1774. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0027.
208. Ahmed FE, Jeffries CD, Vos PW, et al. Diagnostic microRNA markers for screening sporadic human colon cancer and active ulcerative colitis in stool and tissue. *Cancer Genomics Proteomics*. 6(5):281-295. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996134>. Accessed March 5, 2017.
209. Wu CW, Ng SC, Dong Y, et al. Identification of microRNA-135b in Stool as a Potential Noninvasive Biomarker for Colorectal Cancer and Adenoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(11):2994-3002. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1750.
210. Zhu Y, Xu A, Li J, et al. Fecal miR-29a and miR-224 as the noninvasive biomarkers for colorectal cancer. *Cancer Biomarkers*. 2016;16(2):259-264. doi:10.3233/CBM-150563.
211. Yau TO, Wu CW, Dong Y, et al. microRNA-221 and microRNA-18a identification in stool as potential biomarkers for the non-invasive diagnosis of colorectal carcinoma. *Br J Cancer*. 2014;111(9):1765-1771. doi:10.1038/bjc.2014.484.
212. Reinert T, Schøler L V, Thomsen R, et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut*. 2016;65(4):625-634. doi:10.1136/gutjnl-2014-308859.
213. Tie J, Kinde I, Wang Y, et al. Circulating tumor DNA (ctDNA) as a marker of recurrence risk in stage II colon cancer. *J Clin Oncol*. 2014. doi:10.1200/jco.2014.32.15\_suppl.11015.
214. Kidess E, Heirich K, Wiggin M, et al. Mutation profiling of tumor DNA from plasma and tumor tissue of colorectal cancer patients with a novel, high-sensitivity multiplexed mutation detection platform. *Oncotarget*. 2015;6(4):2549-2561. doi:10.18632/oncotarget.3041.
215. Guadalajara H, Domínguez-Berzosa C, García-Arranz M, et al. The concentration of deoxyribonucleic acid in plasma from 73 patients with colorectal cancer and apparent clinical correlations. *Cancer Detect Prev*. 2008;32(1):39-44. doi:10.1016/j.cdp.2008.01.002.
216. Spindler K-LG, Boysen AK, Palisgaard N, et al. A systematic review and meta-analysis of the prognostic value of total cell-free DNA quantification in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(suppl\_6). doi:10.1093/annonc/mdw370.114.
217. Philipp AB, Stieber P, Nagel D, et al. Prognostic role of methylated free circulating DNA in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2012;131(10):2308-2319. doi:10.1002/ijc.27505.
218. Spindler K-LG, Appelt AL, Pallisgaard N, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2014;135(12):2984-2991. doi:10.1002/ijc.28946.

219. El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, et al. Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin Cancer Res.* 2016;22(12):3067-3077. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0297.
220. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6(224):224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094.
221. Spindler K-LG, Pallisgaard N, Andersen RF, Jakobsen A. Changes in mutational status during third-line treatment for metastatic colorectal cancer-Results of consecutive measurement of cell free DNA, *KRAS* and *BRAF* in the plasma. *Int J Cancer.* 2014;135(9):2215-2222. doi:10.1002/ijc.28863.
222. Mohan S, Heitzer E, Ulz P, et al. Changes in Colorectal Carcinoma Genomes under Anti-EGFR Therapy Identified by Whole-Genome Plasma DNA Sequencing. Horwitz MS, ed. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004271. doi:10.1371/journal.pgen.1004271.
223. Ho GYF, Jung HJ, Schoen RE, et al. Differential expression of circulating microRNAs according to severity of colorectal neoplasia. *Transl Res.* 2015;166(3):225-232. doi:10.1016/j.trsl.2015.02.004.
224. Hur K, Toiyama Y, Schetter AJ, et al. Identification of a metastasis-specific MicroRNA signature in human colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(3). doi:10.1093/jnci/dju492.
225. Matikas A, Voutsina A, Trypaki M, Georgoulas V. Role of circulating free DNA in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2016;8(12):810-818. doi:10.4251/wjgo.v8.i12.810.
226. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, et al. Clinical validation of the detection of *KRAS* and *BRAF* mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med.* 2014;20(4):430-435. doi:10.1038/nm.3511.
227. Rogosnitzky M, Danks R. Validation of blood testing for K-ras mutations in colorectal and pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 2010;30(7):2943-2947. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683036>. Accessed February 28, 2017.
228. Xu J-M, Liu X-J, Ge F-J, et al. *KRAS* mutations in tumor tissue and plasma by different assays predict survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33(1):104. doi:10.1186/s13046-014-0104-7.
229. Morgan SR, Morgan J, Jessica Whiteley E, et al. Comparison of *KRAS* Mutation Assessment in Tumor DNA and Circulating Free DNA in Plasma and Serum Samples. *Clin Med Insights Pathol.* 2012;5:15. doi:10.4137/CPath.S8798.
230. Janku F, Angenendt P, Tsimberidou AM, et al. Actionable mutations in plasma cell-free DNA in patients with advanced cancers referred for experimental targeted therapies. *Oncotarget.* 2015;6(14):12809-12821. doi:10.18632/oncotarget.3373.
231. Tabernero J, Lenz H-J, Siena S, et al. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(8):937-948. doi:10.1016/S1470-2045(15)00138-2.
232. Spindler K-LG, Pallisgaard N, Vogelius I, Jakobsen A. Quantitative Cell-Free DNA, *KRAS*, and *BRAF* Mutations in Plasma from Patients with Metastatic Colorectal Cancer during Treatment with Cetuximab and Irinotecan. *Clin Cancer Res.* 2012;18(4):1177-1185.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0564.

233. Tie J, Kinde I, Wang Y, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1715-1722. doi:10.1093/annonc/mdv177.
234. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012;486(7404):532-536. doi:10.1038/nature11156.
235. Diaz Jr LA, Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012;486(7404):537. doi:10.1038/nature11219.
236. Kjersem JB, Ikdahl T, Lingjaerde OC, Guren T, Tveit KM, Kure EH. Plasma microRNAs predicting clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line oxaliplatin-based treatment. *Mol Oncol*. 2014;8(1):59-67. doi:10.1016/j.molonc.2013.09.001.
237. Hu J, Cai G, Xu Y, Cai S. The Plasma microRNA miR-1914\* and -1915 Suppresses Chemoresistant in Colorectal Cancer Patients by Down-regulating NFIX. *Curr Mol Med*. 2016;16(1):70-82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26695693>. Accessed March 5, 2017.
238. Chen Q, Xia H-W, Ge X-J, Zhang Y-C, Tang Q-L, Bi F. Serum miR-19a predicts resistance to FOLFOX chemotherapy in advanced colorectal cancer cases. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(12):7421-7426. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24460313>. Accessed April 22, 2017.
239. Spindler K-LG, Pallisgaard N, Appelt AL, et al. Clinical utility of KRAS status in circulating plasma DNA compared to archival tumour tissue from patients with metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor therapy. *Eur J Cancer*. 2015;51(17):2678-2685. doi:10.1016/j.ejca.2015.06.118.
240. Spindler K-LG, Sorensen MM, Pallisgaard N, et al. Phase II trial of temsirolimus alone and in combination with irinotecan for KRAS mutant metastatic colorectal cancer: Outcome and results of KRAS mutational analysis in plasma. *Acta Oncol (Madr)*. 2013;52(5):963-970. doi:10.3109/0284186X.2013.776175.
241. Spindler K-LG, Pallisgaard N, Andersen RF, Ploen J, Jakobsen A. Pemetrexed and Gemcitabine for Chemotherapy Refractory Colorectal Cancer—Results of a Phase II and Translational Research Study. *J Cancer Ther*. 2013;4(6):44-50. doi:10.4236/jct.2013.46A2006.
242. Spindler K-LG, Pallisgaard N, Andersen RF, Ploen J, Jakobsen A. Gemcitabine and capecitabine for heavily pre-treated metastatic colorectal cancer patients—a phase II and translational research study. *Anticancer Res*. 2014;34(2):845-850. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24511021>. Accessed February 28, 2017.
243. Spindler KG, Appelt AL, Pallisgaard N, Andersen RF, Jakobsen A. KRAS-mutated plasma DNA as predictor of outcome from irinotecan monotherapy in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2013;109(12):3067-3072. doi:10.1038/bjc.2013.633.
244. Beeharry MK, Liu W-T, Yan M, Zhu Z-G. New blood markers detection technology: A leap in the diagnosis of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(3):1202. doi:10.3748/wjg.v22.i3.1202.

245. Heitzer E, Auer M, Gasch C, et al. Complex Tumor Genomes Inferred from Single Circulating Tumor Cells by Array-CGH and Next-Generation Sequencing. *Cancer Res.* 2013;73(10):2965-2975. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4140.